

Igor Thiago Borges de Queiroz e Silva

**Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo,
Brasil (1999-2010): aspectos epidemiológicos e moleculares.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso

SÃO PAULO / SP

2013

Igor Thiago Borges de Queiroz e Silva

**Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo,
Brasil (1999-2010): aspectos epidemiológicos e moleculares.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso

SÃO PAULO / SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Queiroz e Silva, Igor Thiago Borges de

Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo, Brasil (1999-2010) :
aspectos epidemiológicos e moleculares / Igor Thiago Borges de Queiroz e Silva. -- São
Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral 2.*Leishmania infantum* 3.HIV 4.Letalidade
5.Recidiva 6.Reação em cadeia da polimerase 7.Polimorfismo de fragmento de restrição
8.Comorbidade 9.Leishmaniose visceral/mortalidade 10. Leishmaniose
visceral/quimioterapia 11.Leishmaniose visceral/terapia 12.*Leishmania infantum*/efeitos de
drogas 13.Síndrome de imunodeficiência adquirida/mortalidade 14.Reação em cadeia da
polimerase/métodos 15.Polimorfismo de fragmento de restrição/genética 16.Leishmaniose
visceral/epidemiologia 17.Síndrome de imunodeficiência adquirida/parasitologia
18.Anfotericina B 19.DNA de cinetoplasto 20.Efeito de coortes 21.Leishmaniose
visceral/genética 22.Resultado de tratamento

USP/FM/DBD-213/13

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A DEUS, aos meus pais, à minha esposa e à
minha família.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador José Angelo Lauletta Lindoso pela orientação e dicas durante o desenvolvimento desse estudo, na preparação da tese e na minha formação profissional.

À Professora Dra. Hiro Goto, pelas orientações importantes para minha formação e pelas discussões esclarecedoras.

Ao Dr. Diego Alonso, Dr. Paulo Ribola e toda equipe do laboratório de imunogenética da UNESP-Botucatu/SP por ter cedido espaço físico e equipamentos para realização das reações moleculares, além das informações relevantes a essa fase do estudo.

À Geraldine Madalosso e à Carmen Sanches pela calma e paciência durante as análises estatísticas.

Ao Dr. Carlos Magno Fortaleza pela gentileza em ceder amostras de pacientes provenientes do Hospital Estadual de Bauru Dr. Arnaldo Prado Curvêllo.

Ao CVE/SES/SP, nas figuras de Lisete Cruz e João Fred, que no início do projeto foram cruciais ao disponibilizar banco de dados de leishmaniose visceral do Estado de São Paulo.

Ao corpo clínico, aos residentes e ao laboratório do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER), pelos conhecimentos repassados durante a residência médica em infectologia e pelas amostras dos pacientes cedidas para análise.

À área técnica do CRT-DST/AIDS e do Ministério da Saúde, pela disponibilização dos dados para a pesquisa, referentes à infecção pelo HIV.

A toda equipe do laboratório de soropidemiologia do IMT/SP (Eduardo, Luiza, Simone, Ive, Amanda, Lilian, Edna, Thaynan, Cristiane, Flaviane, Sandra, Beatriz), que me apoiaram numa área até então desconhecida e com muitas novidades a serem descobertas.

Às secretárias do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP (Roseli e Vânia), que sempre foram muito solícitas quando requisitadas.

Aos amigos e familiares que sempre acreditaram que esse sonho poderia ser realidade, incentivando-me nos momentos difíceis e comemorando nas alegrias.

Aos professores do Departamento de Infectologia da UFRN, que me ensinaram e me apoiaram desde a graduação em medicina até à pós-graduação, mesmo à distância ou nos encontros em congressos.

Επίγραφε

EPÍGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LV	Leishmaniose Visceral
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
RN	Rio Grande do Norte
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EUA	Estados Unidos da América
UNAIDS	<i>United Nations Program on HIV/AIDS</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
IFI	<i>Indirect Immunofluorescence</i>
ARV	Antirretrovirais
TARV	Terapia Antirretroviral
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
AnBL	Anfotericina B lipossomal
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SP	São Paulo
kDNA	Kinetoplast DNA
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>
MLMT	<i>Multilocus Microsatellite Typing</i>
RAPD	<i>Randon Amplification of Polymorphic DNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SINAN	Sistema de Agravos de Notificação

SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4 ⁺ /CD8 ⁺ e Carga Viral
SICLOM	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
DNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i>
RESTDIST	<i>Restriction Fragments Distance</i>
UPGMA	<i>Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor
IL	Interleucina
INF	Interferon
AnBd	Anfotericina B deoxicolato
AP	Antimonial Pentavalente
IMC	Índice de massa corporal
IP	Inibidor da Protease
IMT/SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
CRT	Centro de Referência em Tratamento

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Distribuição por raça dos casos de LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	49
Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	50
Tabela 3 – Letalidade e recidiva nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	51
Tabela 4 – Distribuição dos óbitos por faixa etária nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	51
Tabela 5 – Distribuição das recidivas por faixa etária nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	52
Tabela 6 – Características demográficas e clínicas, de acordo com a terapêutica anti- <i>Leishmania</i> utilizada, de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	54
Tabela 7 - Avaliação da resposta ao tratamento anti- <i>Leishmania</i> , de acordo com desfechos positivos e negativos, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	56
Tabela 8 - Avaliação da resposta ao tratamento anti- <i>Leishmania</i> , separado por desfecho apresentado, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	57
Tabela 9 – Comparação de desfechos positivos e negativos da resposta ao tratamento anti- <i>Leishmania</i> , separados por droga utilizada no tratamento, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	57

Tabela 10 – Avaliação da resposta ao tratamento anti- <i>Leishmania</i> , separados por droga utilizada e por desfecho apresentado, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	58
Tabela 11 – Comparativo entre contagem de linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e carga viral (medianas) de coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	59
Tabela 12 - Porcentagem de pacientes em uso de TARV, de acordo com os desfechos apresentados em coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	59
Tabela 13 - Análise bivariada dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS segundo evolução (cura, óbito), no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral	23
Figura 2 – Coinfecção HIV/ <i>Leishmania</i> no mundo	27
Figura 3 – Distribuição por percentual dos casos confirmados de LV, de acordo com a disponibilidade do resultado de sorologia para HIV (HIV negativos, HIV positivos e ignorados), no Estado de São Paulo no período de 1999 a 2010	45
Figura 4 – Distribuição anual dos casos de LV e LV-HIV/AIDS, e porcentagem de coinfectados LV-HIV/AIDS, no Estado de São Paulo no período de 1999 a 2010	45
Figura 5 – Distribuição por faixa etária dos casos de LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	46
Figura 6 – Distribuição por percentual dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS de acordo com a faixa etária, no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	47
Figura 7 - Distribuição por percentual dos casos de LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS de acordo com o sexo, no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	48
Figura 8 – Fluxograma dos casos de coinfectados LV-HIV/AIDS tratados no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	53
Figura 9 – Distribuição cumulativa dos casos de LV (HIV-negativo) no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	63
Figura 10 – Distribuição cumulativa dos casos de coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	64
Figura 11 – Distribuição cumulativa dos óbitos de LV (HIV-negativo) no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	65
Figura 12 – Distribuição cumulativa dos óbitos de coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010	66
Figura 13 – Análise do produto amplificado por reação em cadeia da polimerase	67

- Figura 14 – Representação da eletroforese capilar após digestão com enzimas de restrição e separação por polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) de amostras de pacientes 68
- Figura 15 – Árvore fenética (UPGMA) construída com os dados de RFLP do kDNA, mostrando a distribuição de 40 isolados de *Leishmania (L.) infantum*. 70

RESUMO

Queiroz-e-Silva ITB. Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo, Brasil (1999-2010): aspectos epidemiológicos e moleculares [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose atinge milhões de indivíduos mundialmente, relacionada a mudanças ambientais, urbanização, migração e susceptibilidade do hospedeiro. O aumento de casos de leishmaniose visceral (LV) em áreas urbanas pode ser explicado, não só pela adaptação do vetor a diferentes situações ambientais, circulação do parasito e introdução de hospedeiro infectado, como também pela intersecção com áreas de transmissão do HIV. No Brasil, a distribuição dos coinfectados acompanha os grupos de risco para HIV/AIDS (adultos, sexo masculino). A coinfeção LV-HIV/AIDS é registrada com grande frequência no Estado de São Paulo, onde há aumento da prevalência desta coinfeção, assim como da recidiva e da letalidade por LV. Fatores contribuintes para esta elevação, como possíveis determinantes da gravidade da LV em pacientes HIV/AIDS, não estão claros, sejam relacionados ao hospedeiro ou ao parasito. **OBJETIVOS:** Avaliar o comportamento clínico, epidemiológico, terapêutico e imunológico e a variação genotípica do parasito na coinfeção LV-HIV/AIDS, comparando com pacientes HIV-negativos, em pacientes do Estado de São Paulo. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Coorte retrospectiva, utilizando dados secundários de programas de rotina epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e do Ministério da Saúde do Brasil, entre 1999-2010. Análise molecular por PCR-RFLP do kDNA de *Leishmania (L.) infantum* de aspirado de medula óssea para desenvolvimento de uma árvore fenética, comparando os indivíduos entre si quanto ao desfecho, sexo, idade e infecção pelo HIV. **RESULTADOS:** 1614 casos de LV e 117 (7,25%) de coinfectados LV-HIV/AIDS, com predomínio destes no sexo masculino, entre os 31-50 anos de idade. Tríade febre e hepatoesplenomegalia foi mais frequente no grupo HIV-negativo. Maior letalidade por LV (24,2 x 8,2 – $p = 0,000$) e recidiva (10,5 x 1,8 – $p = 0,000$) nos pacientes HIV-positivos comparando aos HIV-negativos. Entre os coinfectados, observou-se maior taxa de cura quando a LV foi tratada com Antimonial Pentavalente (69,44%) e Anfotericina B lipossomal (63,82%), $p=0,223$. Maiores falhas (16,66%, $p = 0,034$) e letalidade (41,66%, $p = 0,192$) quando tratado com Anfotericina B deoxicolato. Maiores recidivas (14,89% - $p = 0,076$) e

nenhuma falha com Anfotericina B lipossomal. Houve maior mediana de linfócitos T CD4⁺ (135) e T CD8⁺ (550) no grupo de cura dos pacientes LV-HIV/AIDS e houve 50% de recidivas em uso de terapia antirretroviral. A distribuição dos genótipos de *Leishmania (L.) infantum* não apresentou relação com nenhum dos desfechos avaliados. CONCLUSÕES: Os resultados obtidos revelam pela primeira vez a magnitude da comorbidade LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, com repercussão direta na recidiva e na letalidade da LV. Há aumento do número de casos de LV e LV-HIV/AIDS nessa região, com maior prevalência de coinfectados em adultos do sexo masculino. Maior letalidade e recidiva nos HIV-positivos e com pior desfecho quando tratado com Anfotericina B deoxicolato. Recidiva elevada quando tratado com Anfotericina B lipossomal, embora sem falhas. Pouca proteção da terapia antirretroviral na proteção das recidivas. Muitos dados incompletos quanto à infecção pelo HIV. PCR-RFLP não discrimina casos HIV-positivos dos HIV-negativos, nem mostra relação direta das recidivas e óbitos com um genótipo específico do parasita, podendo a evolução do paciente estar relacionada diretamente com a resposta do hospedeiro.

Descritores: Leishmaniose Visceral; HIV; AIDS; Tratamento; Letalidade; Recidiva; PCR-RFLP.

ABSTRACT

Queiroz-e-Silva ITB. Comorbidity visceral leishmaniasis/AIDS in São Paulo State, Brazil (1999-2010): epidemiological and molecular aspects. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

INTRODUCTION: Leishmaniasis affects millions of individuals worldwide, related to environmental changes, urbanization, migration, and host susceptibility. The increase in cases of visceral leishmaniasis (VL) in urban areas can be explained not only by the vector adaptation to different environmental situations, movement of the parasite and introduction infected host, as well as the intersection with areas of HIV transmission. In Brazil, the distribution of coinfection is accompanying risk groups for HIV/AIDS (adult male). Coinfection VL-HIV/AIDS is recorded with great frequency in São Paulo State, where there is an increased prevalence of co-infection, as well as relapse and lethality by VL. Factors contributing to this increase, as possible determinants of severity of VL in HIV/AIDS patients are not clear, either related to the host or the parasite.

OBJECTIVES: To evaluate the clinical, epidemiological, therapeutic and immunological aspects of coinfection VL-HIV/AIDS and genotypic variation in the parasite, compared with HIV-negative patients in the State of São Paulo.

MATERIALS AND METHODS: Retrospective cohort study using secondary data from epidemiological routine programs of the State Department of Health of São Paulo and the Ministry of Health of Brazil, between 1999 to 2010. Molecular analysis by PCR-RFLP kDNA of *Leishmania (L.) infantum* from bone marrow aspirate to develop a phenetic tree, comparing individuals with each other about the outcome, gender, age and HIV infection.

RESULTS: 1614 cases of VL and 117 (7.25%) of coinfection VL-HIV/AIDS, predominantly those in males, between 31-50 years old. Triad of fever and hepatosplenomegaly was more frequent among HIV-negative. Increased mortality by VL (24.2 x 8.2 – $p = 0,000$) and recurrence (10.5 x 1.8 – $p = 0,000$) in HIV-positive patients compared to HIV-negative. Among coinfection, there was a higher cure rate when the VL was treated with pentavalent antimony (69.44%) and liposomal amphotericin B (63.82%), $p = 0.223$. Major failures (16.66%, $p = 0.034$) and mortality (41.66%, $p = 0.192$) when treated with amphotericin B deoxycholate. Major recurrences (14.89% - $p = 0.076$) and no failure with amphotericin B liposome. There were a higher median TCD4⁺ (135) and TCD8⁺ (550) lymphocytes in the group of cures and relapse

was 50% in those using antiretroviral therapy. The genotype distribution of *Leishmania (L.) infantum* was not associated with any of the outcomes assessed. CONCLUSIONS: These results show for the first time the magnitude of comorbidity VL-HIV/AIDS in São Paulo State, with direct impact on recurrence and mortality of VL. There are increasing numbers of cases of VL and VL-HIV/AIDS in this region, with the highest prevalence of coinfection in adult males. There is an increased mortality and recurrence in HIV-positive and with worse outcome when treated with amphotericin B deoxycholate. High relapse when treated with liposomal amphotericin B, although flawless. There is little protection of antiretroviral therapy in relapses. There are many incomplete data regarding HIV infection. PCR-RFLP does not discriminate HIV-positive cases from HIV-negative ones or showed direct nexus from recurrences and deaths with a specific genotype of the parasite, but instead could be directly related to the host response.

Key words: Visceral Leishmaniasis; HIV; AIDS; Treatment; Lethality; Relapse; PCR-RFLP.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

	Página
INTRODUÇÃO	22
1 – A leishmaniose visceral	22
1.1 – Fatores epidemiológicos	22
1.2 – Formas clínicas	24
1.3 – Agente etiológico e diagnóstico	24
2 – O vírus da imunodeficiência humana (HIV)	25
3 – A coinfeção LV-HIV/AIDS	26
4 – Tratamento	28
4.1 – O tratamento da LV	28
4.2 – Terapia antirretroviral (TARV) na coinfeção LV-HIV/AIDS	29
5 – Genotipagem dos minicírculos do cinetoplasto (kDNA)	30
6 – Considerações e hipóteses	31
JUSTIFICATIVAS	32
OBJETIVOS	33
MÉTODOS	34
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85

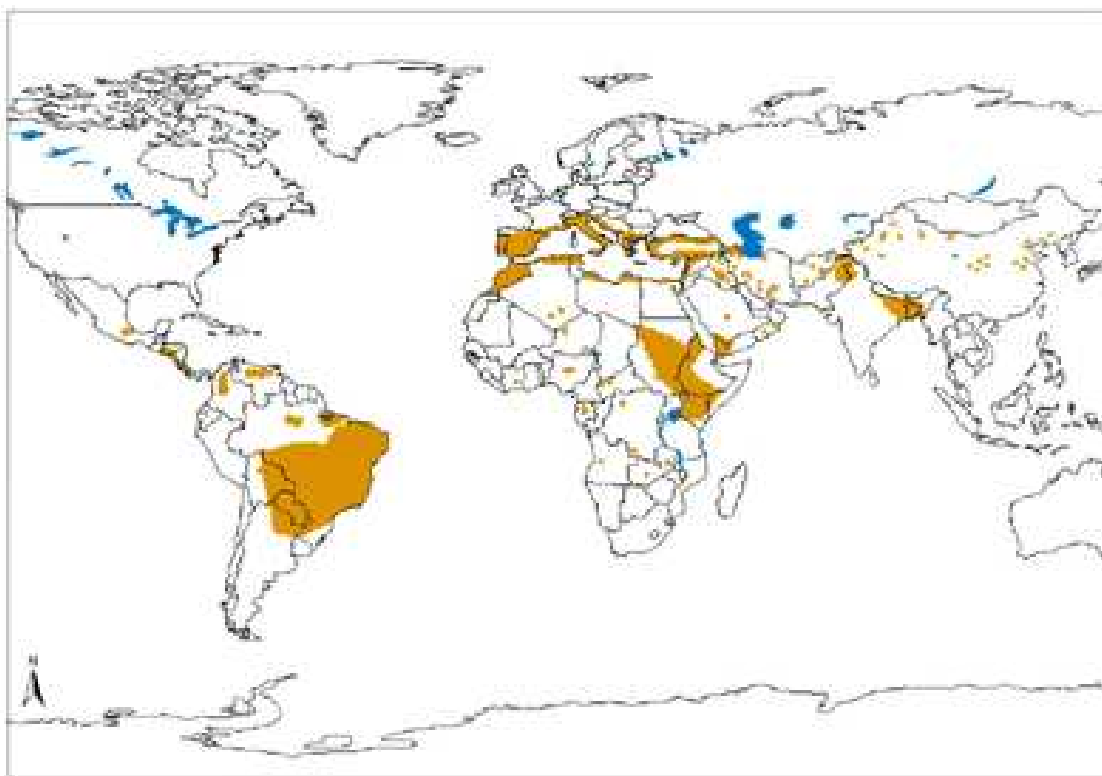
INTRODUÇÃO

1) *A leishmaniose visceral*

1.1 – *Fatores epidemiológicos*

A leishmaniose é uma protozoose mundialmente conhecida, causada pelos protozoários do gênero *Leishmania*, que é transmitido ao homem pela picada da fêmea do inseto vetor do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e pelo gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Magill, 2010). Entretanto, o ciclo antroponótico da leishmaniose visceral (LV), quando o homem também se torna o reservatório da doença, tem sido documentado no sudeste asiático com a *Leishmania donovani* e, artificialmente, em pacientes HIV-positivos na Europa com a *Leishmania infantum*, durante o compartilhamento de seringas contaminadas entre usuários de drogas (Cruz *et al*, 2006). Cerca de 350 milhões de indivíduos (homens, mulheres e crianças) estão em áreas de risco para leishmaniose e a doença ocorre em 98 países ao redor do mundo (Figura 1), sendo a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo (Balasegaram *et al*, 2012). Atualmente, cerca de 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorrem mundialmente por ano (WHO, 2013).

No Brasil, a LV está presente em 22 dos 27 estados da federação e nas cinco regiões, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (Brasil/MS, 2011). Há um aumento do número de casos desde 1999, principalmente, devido a migrações rurais para centros urbanos, quando ocorre formação de favelas com péssimas condições de vida, criando um cenário para a introdução de um novo parasita numa área de indivíduos não imunes (Brasil/MS, 2006). Nas décadas de 50 a 70, a LV era predominantemente rural, alcançando as periferias de várias cidades nos anos 80. A partir da década de 90, a LV ocorre em ambiente urbanizado (Nascimento *et al*, 2011; Daher *et al.*, 2009; Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010).



FONTE: WHO, outubro de 2010.

Figura 1 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral [Imagem obtida da internet] Em amarelo, destacam-se as áreas endêmicas para leishmaniose visceral: América Latina (principalmente Brasil), África Mediterrânea e Oriental (principalmente), Europa Mediterrânea, Ásia e Continente Indiano.

Anualmente, ocorrem entre dois a três mil novos casos de LV no Brasil, gerando um coeficiente de incidência de 2:100.000 habitantes, com uma letalidade média de 6,1% entre os anos de 1980 e 2005 (Madalosso *et al*, 2012). Frequentemente, os cães são os reservatórios nesse ambiente e as crianças abaixo de 10 anos são as mais atingidas (54,4%), sendo que 60% dos casos ocorrem no sexo masculino (Brasil/MS, 2006). Nos centros urbanos e periurbanos, onde vem ocorrendo um aumento do número de casos de LV, esse perfil epidemiológico apresenta recente mudança, sendo que os indivíduos adultos jovens são os mais acometidos, como ocorre em Natal/RN, na região Nordeste do país (Lima *et al.*, 2012).

No Estado de São Paulo, os primeiros casos de LV de transmissão autóctone surgiram em 1999 no município de Araçatuba, havendo posterior expansão da doença para outros municípios da região Noroeste do Estado (Madalosso, 2012).

1.2 – Formas clínicas

As principais formas clínicas da leishmaniose são a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV), estando quase 90% dos novos casos de LV presentes em apenas seis países: Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia e Sudão (WHO, 2013). Embora na maioria dos casos possa haver indivíduos com infecção assintomática, a LV se caracteriza por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, perda de peso progressiva e pancitopenia, podendo ser fatal se não tratada. O desfecho em cada paciente depende de fatores do parasita (invasividade, tropismo, patogenicidade), da resposta imune celular mediada (determinada geneticamente pelo hospedeiro) e do estado nutricional do indivíduo infectado (Magill, 2010). Está relacionada à má nutrição, condições sócio-econômicas desfavoráveis, mudanças ambientais e climáticas, urbanização desorganizada, igracão e susceptibilidade do hospedeiro (WHO, 2011a; Madalosso *et al.*, 2012) Num estudo retrospectivo entre os anos de 1999 a 2005, foi verificado que anemia grave (hemoglobina $\leq 5,0$ g/dl), elevação da bilirrubina total ($\geq 2,0$ mg/ml), febre por mais de 60 dias, idade acima de 50 anos, manifestações hemorrágicas, diarréia, alterações cardíacas e infecções bacterianas são fatores relacionados com letalidade por LV (Madalosso *et al.*, 2012).

1.3 – Agente etiológico e diagnóstico

A LV é doença causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* no continente americano, assim como no Sudoeste da Europa, mostrando ser o mesmo agente etiológico, que foi introduzido no Novo Mundo na época do descobrimento. No continente asiático (Índia, Nepal, Bangladesh) e na África Oriental (Sudão, Etiópia) é provocada pela *Leishmania donovani* (Kuhls *et al.*, 2011). Ambas as espécies pertencem ao Complexo *Leishmania donovani*. Membros da ordem *Kinetoplastidae* e da família *Trypanosomatidae*, as leishmânias são organismos digenéticos, apresentando-se sob duas formas principais: amastigota, intracelular dos macrófagos de mamíferos, e promastigota, flagelada e extracelular, presente no interior do inseto vetor e nos meios de cultura (Magill, 2010). O diagnóstico da leishmaniose visceral é realizado através da combinação de sinais clínicos com testes parasitológicos ou sorológicos. Seu diagnóstico parasitológico é realizado através da detecção de formas amastigotas de *Leishmania spp* em material de aspirado de medula óssea ou punção esplênica, de

promastigotas em culturas específicas (Novy-McNeal-Nicolle ou Schneider's modificado, entre outros), ou do encontro de DNA com uso da PCR. Testes sorológicos e imunológicos (ELISA, anti-rK39, teste de aglutinação direta) detectam anticorpos anti-Leishmania e podem ser utilizados no auxílio diagnóstico da LV. Reações de hipersensibilidade tardia (Teste de Montenegro) são negativos quando a LV esta em atividade e tornam-se positivas na maioria daqueles indivíduos tratados com sucesso ou com cura espontânea (Magill, 2010).

2) *O vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

Descoberto em 1981 nos EUA em jovens homossexuais apresentando pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e sarcoma de Kaposi, o HIV atinge células do sistema imunológico (linfócitos T CD4⁺, principalmente) e promove imunossupressão no organismo do hospedeiro infectado (DeVita Jr, 1992). Nessa população de infectados, promove o surgimento de infecções oportunistas e neoplasias hematológicas quando a contagem de linfócitos TCD4⁺ está em níveis abaixo de 200 células/ μ l (DeVita Jr, 1992). Até 2011, existiam aproximadamente 34,2 milhões de indivíduos infectados pelo HIV no mundo e, entre eles, cerca de 490.000 infectados convivem com o HIV no Brasil. Em 2011, no mundo inteiro, houve 1,7 milhão de mortes relacionadas à infecção pelo HIV e, entre estas, 15.000 mortes ocorreram no Brasil. (UNAIDS, 2013). O diagnóstico da infecção é realizado através de testes imunológicos (ELISA, Western-blot, IFI) e/ou a presença de cópias do vírus detectadas pela carga viral, a qual também quantifica o número de cópias por microlitro. Para tratamento, várias classes de drogas de antirretrovirais (ARV) estão disponíveis, entre elas: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos, inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, inibidores da protease, inibidores da fusão do vírus à célula alvo, inibidores da integrase, inibidores de co-receptores. Os ARV's tem a função de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, a infecção de novas células do sistema imunológico, permitindo o aumento das células T CD4⁺.

Os linfócitos TCD8⁺ são células efetoras que tem papel importante na restrição da replicação do HIV mediada pelo sistema imunológico, atuando ativamente no controle da replicação do HIV. Os linfócitos TCD4⁺ são células auxiliares que tem papel crítico na indução e manutenção de uma efetiva resposta mediada pelos TCD8⁺,

na restrição da replicação viral (Moir *et al.*, 2010). No acompanhamento do paciente HIV-positivo, o nível de linfócitos T CD4⁺ indica um marcador de *status* imunológico e quanto maior esse valor, melhor estará o paciente infectado; por outro lado, a carga viral representa o *fitness* do HIV e quanto menor, melhores serão as condições do paciente, revelando sucesso da terapia antirretroviral (TARV). Para definição de um caso de AIDS, o indivíduo deve apresentar infecções oportunistas (Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, Neurotoxoplasmose, Tuberculose Extra-pulmonar, entre outras) e ter evidência laboratorial de infecção pelo HIV (teste sorológico de triagem [ELISA, EIA] + teste sorológico suplementar [Western-blot, IFI] ou teste virológico para HIV detectável [PCR, p24]) (Schneider *et al.*, 2008). Até o momento, a LV ocorre em populações negligenciadas e não é considerada doença definidora de AIDS de acordo com normas internacionais do CDC (EUA) tampouco do Ministério da Saúde do Brasil (Schneider *et al.*, 2008; Brasil/MS, 2013).

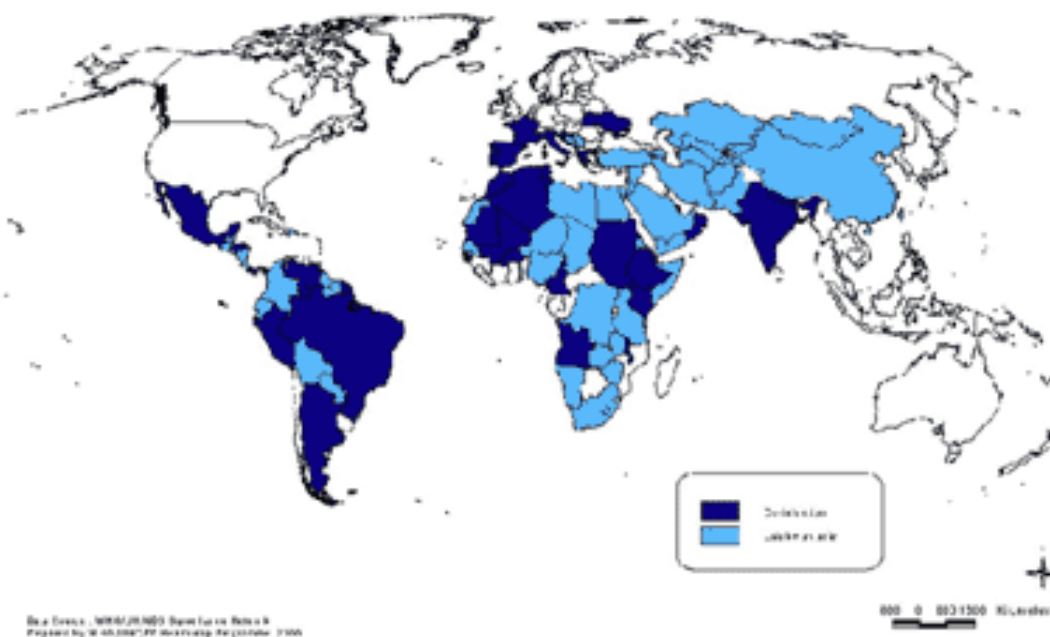
3) A coinfeção LV-HIV/AIDS

O aumento de casos de LV em áreas urbanas pode ser explicado, em parte, por uma expansão dos casos de infecção pelo HIV para áreas endêmicas de LV, alterando as características epidemiológicas desta (Figura 2). Em pacientes HIV positivos, a LV pode induzir uma maior imunossupressão e estimular a replicação viral, levando o paciente ao desenvolvimento da AIDS mais rapidamente. Desse modo, a significância epidemiológica dos infectados assintomáticos aumentaram, visto que a coinfeção acelera também o desenvolvimento da LV manifestando-se, principalmente, quando a contagem de linfócitos T CD4⁺ está menor do que 200 (Brasil/MS, 2006; Alvar *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006).

O impacto da coinfeção é aparente e com crescimento vertiginoso em várias regiões. Aproximadamente 35 países no mundo inteiro relatam a presença da coinfeção *Leishmania*/HIV (WHO, 2011b). No sudoeste europeu (Espanha, França, Itália e Portugal), aproximadamente 70% dos casos de LV estavam associados com a infecção pelo HIV, principalmente nos usuários de drogas endovenosas (Alvar *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006; WHO, 2011b). Atualmente, essa porcentagem diminuiu, tendo em vista a menor transmissão ocorrida devido a distribuição de agulhas e seringas à população de

risco e a ampla utilização da TARV nos pacientes HIV-positivos (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006).

34 Countries Reporting Leishmania / HIV Co-Infection Worldwide



FONTE: WHO, outubro de 2010.

Figura 2 – Coinfecção HIV/*Leishmania* no mundo. Imagem obtida na internet. Azul claro: áreas endêmicas para leishmaniose visceral; azul escuro: áreas onde há casos de coinfecção LV-HIV/AIDS.

No Brasil, a distribuição epidemiológica dos coinfectados acompanha os grupos de risco para transmissão HIV/AIDS, seja por faixa etária (próximo dos 37 anos de idade) ou por sexo (91,9% no masculino) (Rabello *et al.*, 2003). Por ser uma doença bastante grave, a LV possui altas taxas de letalidade, principalmente devido às complicações, tais como: broncopneumonias, gastroenterites, sangramentos, sepses graves, insuficiência cardíaca devido à anemia grave, entre outros (Madalosso *et al.*, 2012). A coinfecção com o HIV induz a um aumento do número de recidivas e permite o surgimento de manifestações clínicas não usuais (trato gastrointestinal, respiratório, cardíaco, renal, adrenal, sinovial e cerebral) (Alvar *et al.*, 1997). É também registrada com maior frequência no Estado de São Paulo, sendo que nessa população de coinfectados LV-HIV/AIDS há maior recidiva e letalidade por LV (Madalosso *et al.*, 2012).

Recentemente, um estudo de revisão sistemática, avaliando os fatores preditores de falha terapêutica da LV em pacientes coinfectados, evidenciou que o uso de profilaxia secundária para leishmaniose é um fator protetor de recidiva e que a contagem de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 100 células/mm³ é um fator preditor de falha terapêutica. Os dados obtidos nessa revisão sistemática, foram a partir da seleção de 18 estudos selecionados na literatura, o que demonstra a escassez de dados de coinfeção *Leishmania*-HIV para melhor embasamento da terapêutica para LV nesses pacientes (Cota *et al*, 2011).

4) Tratamento

4.1 – Tratamento da LV

Atualmente, três principais drogas são usadas no tratamento da LV no mundo: antimonial pentavalente, anfotericina B deoxicolato e anfotericina B lipossomal (Cruz *et al*, 2006). Outras drogas, como miltefosine, paromomicina e pentamidina também são utilizadas com relativo sucesso na África Oriental e Sudeste Asiático, porém ainda sem registro no Brasil para essa finalidade. Os antimoniais pentavalentes são as drogas com maior experiência de uso, entretanto em diversas regiões, principalmente na Índia, há um progressivo aumento da resistência a esta droga, sendo então substituída por outros medicamentos (Sundar, 2001). Ademais, em pacientes coinfectados há aumento importante dos efeitos adversos do antimonial, possivelmente pelo uso concomitante de antirretrovirais que podem exacerbar esses efeitos. Sendo assim, não se recomenda o uso de antimoniais no tratamento das leishmanioses em paciente com HIV/AIDS nas doses atualmente empregadas para tratamento da LV em imunocompetentes. Em decorrência do aumento da resistência ao antimonial e maior quantidade de eventos adversos em pacientes coinfectados, recomenda-se o uso de outros fármacos (Sundar, 2001). Um dos mais empregados é a anfotericina B, principalmente na sua formulação lipossomal. No Brasil, emprega-se a dose total de 20 mg/Kg de peso de anfotericina B lipossomal (AnBL) para o tratamento da LV; entretanto, recidiva tem sido encontrada também nessa população (Brasil/MS, 2011). Em pacientes com severa imunossupressão, a resposta ao tratamento com AnBL nas doses habitualmente empregadas é muito baixa, com frequente recidiva, tendo alguns estudos na África mostrado a semelhança na eficácia da AnBL comparativamente a do estibogluconato de

sódio (Ritmeijer *et al.*, 2011). No entanto, a menor toxicidade quando usada a AnBL elegeu-a como primeira escolha para o tratamento da LV em pacientes com HIV/AIDS. Em relação à profilaxia secundária com AnBL os dados são inconsistentes, podendo ser usado também Anfotericina B deoxicolato, antimonial pentavalente ou isotionato de pentamidina a cada 2 a 4 semanas e ser descontinuada quando os níveis de células T CD4⁺ estiverem acima de 350 células/mm³ (Brasil/MS, 2011).

Em decorrência destes achados, desde o ano de 2006, o Estado de São Paulo tem preconizado o tratamento da LV nos infectados pelo HIV com anfotericina B lipossomal, devido ao maior potencial de gravidade nos coinfectados (SUCEN/CCD/SES/SP, 2006). Mesmo nesses pacientes tratados com anfotericina B lipossomal, há registro de maior recidiva, porém não são conhecidos os fatores relacionados à maior gravidade na população de coinfectados. Especula-se que fatores relacionados ao hospedeiro, tal como a baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ possa ser um fator preditor de recidiva ou letalidade. Porém fatores relacionados ao parasito podem contribuir para este fim.

4.2 – Terapia antirretroviral (TARV) na coinfeção LV-HIV/AIDS

Um fato a ser considerado no tratamento da coinfeção LV-HIV/AIDS é a introdução da TARV, uma vez que a melhora do *status* imunológico do paciente, elevando a contagem de linfócitos T CD4⁺, diminuindo as chances de recidiva. Embora não seja uma emergência médica, deve ser considerado o quanto antes (Brasil/MS, 2011). Na Europa, a introdução da TARV reduziu a incidência da coinfeção LV-HIV/AIDS nessa região, embora apresentando efeito parcialmente protetor contra recidiva (Cruz *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que a introdução da TARV deve ser precoce com o intuito de aumentar os níveis de linfócitos T CD4⁺, haja vista a LV também diminuir essas células. Porém, a TARV por si só não é suficiente para controlar a LV e evitar a recidiva, mesmo com elevação da contagem de linfócitos T CD4⁺ e carga viral do HIV indetectável, sendo necessária continuidade por tempo indeterminado da profilaxia secundária para LV.

5) Genotipagem dos minicírculos do cinetoplasto (kDNA)

É sabido que as leishmanioses apresentam uma ampla variedade de formas clínicas e, aliado à grande diversidade dos hospedeiros susceptíveis com seu próprio patrimônio genético, sugere-se também a presença de variantes genéticas do parasita, gerando uma variabilidade na virulência deste. Várias abordagens moleculares têm sido utilizadas atualmente (PCR-RFLP kDNA, gp63 ou cpb; Multilocus Microsatellite Typing (MLMT); Random Amplification of Polymorphic DNA - RAPD) e a que mais se destaca é a técnica de análise de polimorfismo por tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) do DNA do cinetoplasto (kDNA), ou seja, o DNA mitocondrial dos protozoários tripanossomatídeos (Botilde *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2007). A simples técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) não permite identificar as diferentes espécies de *Leishmania*, sendo assim necessário o uso do RFLP (Laurent *et al.*, 2007). Os primers LINR4 e LIN19, que se ligam numa região conservada dos minicírculos do kDNA (Aransay *et al.*, 2000), são bem utilizados e descritos na literatura, por serem bastante sensíveis para detecção da presença do kDNA do parasito em amostras de diferentes tecidos de hospedeiros infectados por *Leishmania sp.* (Noyes *et al.*, 1998). Através da técnica do RFLP, os números e padrões de fragmentos produzidos permitem uma discriminação refinada entre linhagens do parasita, devido à alta variabilidade genética do DNA do cinetoplasto (Nicolas *et al.*, 2002), sendo utilizada com sucesso: na comparação de linhagens isoladas de diferentes hospedeiros; na identificação de novos genótipos em vetores e hospedeiros e sua resistência a fármacos utilizados no tratamento; na diferenciação entre casos de recidiva e de reinfecção; e na detecção de epidemias (Schonian *et al.*, 2010). O kDNA é formado por uma rede gigante de alguns milhares de DNAs circulares, topologicamente interligados no interior da sua única mitocôndria. São compostos por minicírculos e maxicírculos (90% e 10%, respectivamente). Estes (os maxicírculos, em menor quantidade) codificam os RNAs ribossomais e muitas proteínas envolvidas no metabolismo da mitocôndria; aqueles (os minicírculos, em maior quantidade), controlam pequenos RNAs guias para o correto processamento ou transcrição dos maxicírculos (Alonso *et al.*, 2011). Assim, a análise por RFLP dos minicírculos do DNA do cinetoplasto das leishmânias apresenta maior

poder de resolução quando aplicada no estudo da genética de populações de linhagens muito próximas, tanto geográfica quanto geneticamente (Alonso *et al*, 2011).

6) *Considerações e hipóteses*

Desse modo, fica claro que alguns pontos precisam ser esclarecidos, tais como:

1) Qual a magnitude da LV no Estado de São Paulo, incluindo os casos de coinfeção LV-HIV/AIDS? 2) Há maior recidiva e letalidade nos pacientes coinfectados? 3) A terapêutica específica para LV, antimonial pentavalente ou anfotericina B (e suas formulações), influencia na resposta terapêutica sustentada da LV e previne a recidiva? 4) A recuperação da resposta imunológica, definida pelo aumento da contagem de linfócitos TCD4⁺, é um fator preditor de proteção à recidiva da LV? 5) A terapia antirretroviral precoce influencia no desfecho da LV em pacientes com coinfeção *Leishmania*-HIV? 6) Há diferença genotípica entre espécies de *Leishmania infantum* em pacientes coinfectados com HIV e não coinfectados e, se houver diversidade, há relação com maior recidiva da LV?

Diante dos achados da literatura, bem como a ausência de respostas científicas aos pontos levantados, ratificou-se que a realização de um projeto de pesquisa visando esclarecer esses pontos fosse de suma importância.

JUSTIFICATIVAS

A coinfeção *Leishmania*-HIV comporta-se em determinadas situações clínicas, como uma nova entidade nosológica, despertando grande interesse no cenário mundial, por apresentar piores desfechos em ambas as doenças. O entrecruzamento de áreas de transmissão de LV e HIV/AIDS proporciona notadamente um aumento da prevalência da coinfeção, além do que pacientes com imunossupressão severa podem ser fontes de infecção para flebotomíneos, alterando o ciclo de transmissão com comportamento antroponótico, como ocorre na LV na Índia, causada pela *Leishmania donovani*. Ademais, o compartilhamento de seringas entre usuários de drogas ilícitas injetáveis pode ser também uma fonte de transmissão, tanto de HIV quanto de *Leishmania*.

O aumento da recidiva e da letalidade por LV em pacientes coinfectados com HIV parece estar relacionado a fatores do hospedeiro; entretanto, nada se descreve sobre o papel do parasito nesse processo. Além do que há uma escassez de dados na literatura referentes à coinfeção LV-HIV/AIDS nas Américas, no que se refere aos fatores inerentes ao homem e também ao parasito. Desta forma, pretendemos avaliar quais fatores do hospedeiro estão relacionados à recidiva e letalidade da LV em paciente coinfectados com HIV ou se fatores ligados ao parasito poderiam também influenciar no desfecho clínico do paciente, tal como variações genotípicas.

OBJETIVOS

A) *Principal:*

Avaliar o comportamento clínico, epidemiológico, terapêutico, imunológico e parasitário na coinfeção LV-HIV/AIDS comparando com LV sem infecção pelo HIV em pacientes do Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

B) *Secundários:*

Comparar a letalidade e a recidiva dos pacientes com LV, coinfectados ou não com HIV no período de 1999 a 2010.

Avaliar a resposta terapêutica em pacientes com LV-HIV/AIDS, no Estado de SP no período de 1999 a 2010, avaliando o *status* imunológico (contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺), virológico (carga viral do HIV) e se houve interferência da terapia antirretroviral e anti-*Leishmania* no desfecho.

Estabelecer fatores associados à mortalidade por LV dos pacientes LV-HIV/AIDS, pareando por sexo, faixa etária e droga utilizada.

Demonstrar a distribuição dos casos LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo.

Identificar possíveis variações genotípicas e fenotípicas de *Leishmania infantum* em pacientes com LV coinfectados ou não com HIV, relacionando-as com as manifestações clínicas, a resposta terapêutica anti-*Leishmania* e o desfecho da LV (cura, óbito ou recidiva).

MÉTODOS

1. Delineamento do estudo

Sendo a leishmaniose visceral uma doença de surgimento recente no Estado de São Paulo, optou-se por realizar um estudo inédito através da análise de bancos de dados dos programas de vigilância epidemiológica (detalhado adiante), cujos casos de LV seriam aqueles notificados nesses programas. Na primeira etapa do estudo, foram analisados dados provenientes do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (CVE-SES-SP) e do Programa Estadual de DST, AIDS e Hepatites Virais, através de um estudo de coorte retrospectivo para comparação da letalidade e da recidiva entre pacientes com LV e coinfectados LV-HIV/AIDS, entre os anos de 1999 a 2010, além de análise de fatores clínicos, imunológicos, epidemiológicos e terapêuticos da LV.

Em seguida, foi realizada uma amostragem espacial dos casos de LV e de HIV/AIDS no Estado de São Paulo, avaliando o entrecruzamento de áreas epidemiológicas dessas duas doenças.

Posteriormente, uma análise molecular de amostras de medula óssea de pacientes com LV e LV-HIV/AIDS para desenvolvimento de uma árvore fenética, cuja finalidade foi de comparar as cepas dos diferentes indivíduos infectados.

2. Área de estudo

A área de estudo foi o Estado de São Paulo, que apresenta maior densidade populacional (41.262.199 habitantes) (IBGE, Censo Demográfico 2010), maior incidência de HIV/AIDS (219.788, entre adultos e crianças, até junho de 2012), sendo 33,4% do total nacional (Boletim Epidemiológico AIDS-DST, 2012), e área de introdução recente da leishmaniose visceral urbanizada.

3. *População do estudo*

A população de estudo foi composta de indivíduos com diagnóstico LV no período de 1999 a 2010, coinfectados ou não com o HIV, de todas as faixas etárias e de ambos os sexos. Para avaliação dos critérios clínicos, epidemiológicos e resposta terapêutica foram incluídos 1614 sujeitos da pesquisa, dos quais havia informações nos bancos de dados pesquisados.

4. *Definição e seleção de casos*

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo (2006), define-se:

4.1 – *Caso suspeito de Leishmaniose Visceral em humanos:*

Indivíduo com febre de duração de mais de duas semanas acompanhada de esplenomegalia e proveniente de área com transmissão de LV ou indivíduo de área sem ocorrência de transmissão de LV, com febre de duração de mais de duas semanas acompanhada de esplenomegalia, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região.

4.2 – *Caso confirmado de Leishmaniose Visceral em humanos:*

Um caso suspeito de LV passa a ser confirmado se preencher os seguintes critérios:

4.2.1 - *clínico-laboratorial*

Se houver identificação de *Leishmania (Leishmania) infantum*, a partir da cultura e/ou inoculação em hamster; ou

Se houver encontro de *Leishmania sp.* em exame parasitológico direto por meio de punção e ou biópsia de medula óssea, fígado ou baço.

4.2.2 - *clínico-epidemiológico*

Casos que tenham exame parasitológico direto negativo e sem identificação do agente, com ou sem sorologia reagente, porém com clínica fortemente sugestiva, isto é, paciente com febre e hepatoesplenomegalia acompanhada de pancitopenia, desde que afastadas outras hipóteses diagnósticas, e que apresentem resposta favorável à prova

terapêutica, nos municípios onde já houver confirmação de transmissão autóctone de LV.

4.3 – *Caso confirmado de infecção pelo HIV:*

De acordo com as normas do Ministério da Saúde do Brasil (MS/SVS, 2009), os indivíduos que apresentam um ou mais teste de triagem (ELISA, Imunocromatografia) positivo e um teste confirmatório (IFI, WESTERN-BLOT, imunoblot) também positivo são considerados positivos para infecção pelo HIV.

4.4 – *Critérios de inclusão:*

Casos confirmados parasitologicamente quanto à infecção por *Leishmania sp* com provável infecção adquirida no Estado de São Paulo (casos autóctones) entre os anos de 1999 a 2010, com evolução clínica e droga utilizada definida, que tinham menção sobre à infecção pelo HIV (positivo, negativo ou ignorado).

Foram incluídos os casos confirmados nessas condições notificados no banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), e os casos informados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo.

4.5 – *Critérios de exclusão:*

Casos cujo provável local de infecção não foi município do Estado de São Paulo (casos importados), notificados no período de 1999 a 2010.

Casos autóctones do Estado de São Paulo sem confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania* e sem informação sobre a infecção pelo HIV (em branco).

Casos sem informação sobre tratamento e evolução de acordo com as informações obtidas nos bancos de dados do SINAN e do CVE-SES-SP.

4.6 – *Definição dos desfechos esperados*

De acordo com o Programa Nacional de Controle de Leishmaniose Visceral (Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006), foram definidos os seguintes conceitos, os quais foram adotados neste projeto para fins de definição do caso e avaliação da resposta ao tratamento anti-Leishmania:

4.6.1 – Cura

Desaparecimento da febre, diminuição das vísceras (fígado e baço), ganho ponderal e retorno do apetite, permanecendo o paciente estável por doze meses após o tratamento. Nesses casos, não são necessários controles sorológicos ou parasitológicos.

4.6.2 – Falha

Tratamento regular que não atinge critérios de cura clínica após uma série de tratamento.

4.6.3 – Recidiva

Recrudescimento dos sintomas em até doze meses após a cura clínica

4.6.4 – Caso novo

Reaparecimento de sintomatologia após 12 meses de cura clínica, desde que não haja evidência de imunodeficiência.

4.6.5 – Óbito

Informação sobre óbito por LV ou por outras causas (quando não especificado) até o encerramento do caso foi considerado como óbito no presente estudo.

5. Fonte de dados

Para obtenção de informações sobre LV, suas características clínicas, epidemiológicas e terapêuticas foram realizadas buscas nos bancos de dados de programas de rotina epidemiológica disponíveis, tais como da divisão de zoonoses do CVE/SES/SP e do SINAN.

Quanto aos dados sobre infecção pelo HIV, além dos bancos de dados do CVE/SES/SP e do SINAN, foram realizadas buscas ativas no banco de dados do Programa Estadual de Controle de DST-AIDS de São Paulo. A forma de pesquisa dos dados dos pacientes em cada uma das fontes está descrito abaixo.

5.1. Fonte de dados de pacientes com LV

Os dados referentes às características clínicas, epidemiológicas e terapêuticas da LV e a região geográfica de origem dos casos diagnosticados entre os anos de 1999 a 2010 foram obtidos através de pesquisa na base de dados do Centro de Zoonoses do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

(CVE/CCD/SES/SP) e do Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN/SINANNET). O cruzamento de informações desses bancos de dados foi realizado, confeccionando um banco único para posterior desenvolvimento da análise, visando ter informações mais completas sobre os casos. As informações disponíveis nos bancos de dados foram obtidas da ficha de notificação de casos de LV do SINAN e não foi necessário uma busca nos prontuários médicos.

5.2. Fonte de dados de contagem de linfócitos, carga viral e terapia antirretroviral de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS.

Os resultados da contagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e da carga viral do HIV foram obtidos através do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4⁺/CD8⁺ e Carga Viral (SISCEL). Os dados referentes à terapia antirretroviral foram obtidos junto ao Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM). Ambos os sistemas de apoio laboratorial e de medicamentos foram acessados através da área de Apoio Técnico do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS e Hepatites Virais do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS-SP) – Unidade Santa Cruz, e do Programa Nacional de DST/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil.

Uma busca manual por nome do paciente, data de nascimento e nome da mãe foi realizada nos diferentes bancos de dados, para evitar possíveis duplicidades de nomes, gerando maior confiabilidade dos resultados obtidos.

A contagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e da carga viral e a terapia antirretroviral utilizada na análise foram aquelas disponíveis no momento do diagnóstico de LV e do desfecho do caso (cura, óbito ou recidiva).

No período de 1999 a 2006 não foi possível fazer a distinção entre os infectados ou não pelo HIV, de acordo com a base do SINAN, pois não havia campo na ficha de notificação para preenchimento de tal informação. Nesse período, os dados referentes à infecção pelo HIV foram obtidos exclusivamente junto à Divisão de Zoonoses do CVE-CCD/SES/SP.

6. *Variáveis de Estudo*

As variáveis utilizadas para análise foram: data de notificação, data dos primeiros sintomas, município de notificação, de residência e de provável infecção, idade, sexo, raça, diagnóstico parasitológico, características clínicas (febre, hepatomegalia, esplenomegalia, tosse, emagrecimento, fraqueza), tipo de droga utilizada no tratamento (antimonial pentavalente ou anfotericina B – deoxicolato ou lipossomal), data de início do tratamento, classificação final (confirmação laboratorial ou clínica-epidemiológica) e evolução clínica (cura ou óbito).

7. *Preparação do banco de dados e análise*

Um banco de dados único foi desenvolvido no Microsoft Excel 2007, cruzando informações do CVE/SES/SP e do SINAN para estudo dos casos de LV. As informações não disponíveis no primeiro foram complementadas pelas disponíveis no segundo, e vice-versa. Após a organização de um banco de dados único, os indivíduos repetidos que tinham data de notificação com intervalo entre 30 dias após início do tratamento até um ano deste foram considerados como recidiva. Aqueles com a mesma data de notificação foram considerados duplicidades e foram excluídos do banco desenvolvido. Quanto aos casos de pacientes HIV-positivos, foram cruzadas as informações do CRT-DST/AIDS-SP e do Programa Nacional de DST/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil, visando à obtenção de resultados mais consistentes. A busca foi desenvolvida cruzando os bancos citados pelo nome do paciente, nome da mãe e data de nascimento deste, evitando perda de informações. Assim, foi realizada a análise, com desenvolvimento de tabelas e gráficos no programa Microsoft Excel 2007, para interpretação e demonstração dos resultados obtidos.

8. *Análise estatística*

Utilizando-se do programa GraphPad Prism 3.0 (Qui-quadrado, Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas e Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks para as variáveis contínuas) foi realizada análise estatística dos dados

demográficos obtidos no estudo de coorte retrospectivo e na análise descritiva do tratamento. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes no presente estudo.

Após realizar as análises descritivas e apontar as frequências das variáveis independentes estudadas, foram caracterizados dois grupos distintos: aqueles que evoluíram para cura e os que evoluíram para óbito. Assim, a fim de identificar fatores associados à letalidade por LV, foi desenvolvida uma análise bivariada entre possíveis fatores de risco e o desfecho para óbito, utilizando o programa EpiInfo 3.5.4, cujo banco de dados base foi elaborado no Microsoft Excel 2007. Para as variáveis quantitativas contínuas foi realizado o teste de comparação de médias entre os fatores avaliados segundo evolução para óbito ou cura. Para as variáveis qualitativas foi realizado o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. Foram consideradas as variáveis com valor de $p < 0,05$ para proceder à realização do modelo de regressão logística multivariada, pelo método “*stepwise forward*”, do menor valor de p para o maior.

A existência de associação entre óbito por LV e os fatores de interesse foi investigada pelas estimativas não ajustadas e ajustadas da *Odds Ratio* (OR), com os respectivos intervalos de confiança de 95%, usando regressão logística não condicional. A significância estatística das variáveis nos modelos foi avaliada pelo teste de razão de verossimilhança (Clayton & Hills, 1996).

9. Análise filogenética das cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Para análise filogenética das cepas de *Leishmania (L.) infantum* foram utilizadas 62 amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LV, autóctone do Estado de São Paulo e confirmado parasitologicamente, sendo 12 amostras do Instituto de Infectologia Emilio Ribas em São Paulo/SP (três HIV+) e 50 amostras do Hospital Estadual de Bauru Dr. Arnaldo Prado Curvêllo (seis HIV+). Essas amostras foram utilizadas para avaliar as possíveis diferenças genótípicas e fenótípicas das cepas de *Leishmania (L.) infantum*, com intuito de relacionar as possíveis diversidades moleculares com o quadro clínico, o desfecho e a presença ou não da infecção pelo HIV.

9.1 – Preparação das amostras:

As lâminas de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LV foram utilizadas para obtenção de DNA de *Leishmania* para análise genotípica. O material do aspirado foi obtido por raspagem das lâminas com a utilização de bisturi estéril, conforme descrito por Schonian *et al.*, 2003.

9.2 – Extração do DNA:

O material proveniente da raspagem das lâminas foi processado, utilizado protocolo específico para extração de DNA de medula óssea, com uso do Minikit QIAamp (QIAGEN®), conforme recomendações do fabricante. Contudo, uma eluição em menor volume de tampão (100 µl) foi preferida, tendo em vista a pequena quantidade de material genético presente nas lâminas de aspirado de medula óssea. A quantidade de DNA obtido, bem como a qualidade do mesmo foi analisada através de Nanodrop.

9.3 – Amplificação do DNA:

O DNA extraído foi amplificado utilizando-se os primers LINR4 e LIN19 (Aransay *et al.*, 2000), gerando um fragmento amplificado de 720 pb. Para reação de amplificação por PCR, foi preparado um mix contendo: 31,0 µl de água DNase free, 5,0 µl de Tampão 10x PCR Rxn®, 2,0 µl de MgCl₂ 50mM, 2,0 µl de cada primer de iniciação LINR4 e LIN19 (10 pM/µl), 1,0 µl de DNTP 10mM, e 2,0 µl de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen® - 5 U/µl), gerando um total de 45,0 µl por amostra, na qual foi adicionado 5,0 µl do DNA extraído. As condições de reação no termociclador foram: 3min a 94°C; trinta e três ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C e 1min a 72°C, para desnaturação inicial, anelamento e polimerização, respectivamente; seguido de 10min de extensão final a 72°C. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (0,3 g de agarose + 30 ml de TAE 1x, aquecidos até dissolução completa), utilizando 2,0 µl de GelRed 10.000x como intercalante fluorescente. Após imersão da placa em tampão TAE 1x, foram adicionados 2,0 µl do tampão de corrida (6x DNA loading Dye) e 6,0 µl da amostra de DNA amplificado, tendo como comparador um *ladder* de 100pb, ocorrendo num intervalo de 40 min a 90 V.

As amostras de DNA que não amplificaram conforme esperado foram submetidas à nova amplificação por PCR utilizando os mesmos primers da reação anterior, com o objetivo de aumentar a quantidade de DNA disponível para posterior digestão. O mix da reação continha 37,0 µl de água DNase free, 5,0 µl de Tampão 10x PCR Rxn®, 2,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µl de cada primer de iniciação LINR4 e LIN19 (10 pM/µl), 1,0 µl de DNTP 10mM, e 0,8 µl de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen® - 5 U/µl), gerando um total de 49,8 µl por amostra, na qual foi adicionado 0,2 µl do DNA amplificado anteriormente. As amostras novamente amplificadas foram submetidas à eletroforese capilar (QIAxcel Advanced – QIAGEN®), na qual foram visualizadas bandas mais fortes na região correspondente a 720 pb, de acordo com os primers utilizados na PCR.

9.4 – Digestão do DNA amplificado:

O fragmento obtido da PCR foi submetido à digestão com uso das enzimas *RsaI* (Fermentas Life Science®) e *HpaII* (Thermo Scientific®) em soluções contendo 0,5 µl de cada enzima (10U/µl), separadamente, 1,5 µl de água DNase free e 3,0 µl de tampão (10x buffer Tango with BSA), somados a 20 µl da amostra, as quais foram incubadas a 37°C durante 40 min. O produto digerido foi submetido à eletroforese capilar (QIAxcel Advanced – QIAGEN®), para visualização das amostras digeridas. A partir dos fragmentos gerados após a digestão com as enzimas *RsaI* e *HpaII*, foi desenvolvida uma matriz binária (1 indica presença de um fragmento e 0 a ausência), visando o reconhecimento das bandas entre 120 a 710 pb (de 20 em 20 pb), com uma margem de erro de 2%.

9.5 – Construção da árvore fenética:

A matriz binária obtida a partir das bandas do DNA digerido foi transformada num arquivo de entrada (bloco de notas), no qual foi inserido o número de amostras analisadas, o número de bandas e o número de enzimas utilizadas. Essa matriz alimentada com os descritores foi transformada numa matriz de distância pelo programa RESTDIST (restriction fragments distance, modification of Nei and Li restriction fragments distance method, Nei and Li, 1979*), para separação das amostras pela

* Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci. 1979;76:5269-73.

semelhança dos fragmentos. Essa matriz de distância, por sua vez, foi utilizada para a construção de um dendograma pelo método UPGMA (unweighed pair group method with arithmetic averages) através do programa NEIGHBOR (Laurent *et al*, 2007). Ambos os programas fazem parte de um pacote de programas PHYLIP, versão 3.69, disponível em: <http://evolution.gs.washington.edu/phylip/software.html>. Uma representação gráfica (árvore fenética) foi realizada pelo PhyloDraw, versão 0.8, (Pusan National University, Coréia do Sul), determinando-se assim a semelhança genética das classes dos minicírculos entre as amostras.

10. Considerações sobre questões éticas da pesquisa

A pesquisa incluiu pacientes com diagnóstico de LV coinfectados ou não com HIV que evoluíram para cura, falha terapêutica, recidiva ou para óbito. Em todas as circunstâncias foram observadas as recomendações de respeito à privacidade e à confidencialidade previstas pela Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, Conselho Nacional de Saúde para a Pesquisa Científica em Seres Humanos. O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (Protocolo No. 77/2011 de 16/01/2012), do CRT DST-AIDS/SES/SP (Protocolo No. 023/2011 de 09/11/2011) e da UNESP-Botucatu/SP (Protocolo 4116/2012 de 06/02/2012) e do CEP Central do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer 41259 de 22/06/2012) - CAAE 02017612.6.0000.0065.

Não houve aplicação do TCLE para o paciente visto tratar-se de um estudo retrospectivo, utilizando dados secundários, sem que houvesse a identificação dos sujeitos da pesquisa, sendo então aplicado o termo de confidencialidade.

RESULTADOS

Este estudo foi desenvolvido em quatro etapas. Inicialmente, foi realizado um estudo descritivo dos casos de LV e coinfectados LV-HIV/AIDS, analisando-se os dados demográficos, manifestações clínicas e resposta ao tratamento anti-*Leishmania* e antirretroviral. Com a realização do estudo descritivo, partiu-se para análises bivariadas com o objetivo de determinar os possíveis fatores relacionados com a letalidade por LV nos coinfectados LV-HIV/AIDS. Para melhor compreender a distribuição dos casos de LV e LV-HIV no estado de São Paulo, foi feita análise espacial dos casos, determinando a localização dos casos de LV e de coinfectados LV-HIV/AIDS, assim como dos óbitos relacionados à LV. Finalmente, com o intuito de determinar se havia diferença entre as cepas de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com LV e LV-HIV/AIDS foi realizado estudo molecular das amostras de aspirado de medula óssea analisando-se filogeneticamente as cepas de *Leishmania*.

Estudo descritivo

No período de 1999 a 2010, foram detectados 1614 indivíduos com diagnóstico de LV, com confirmação parasitológica. Do total de 1614 casos de LV, 117 (7,25%) eram HIV-positivos, 1070 (66,29%) eram HIV-negativos e 427 (26,46%) tinham seus dados ignorados quanto à infecção pelo HIV (Figura 3). Nesse período, observou-se aumento progressivo no número de casos de LV no Estado de São Paulo e aumento da proporção de casos coinfectados LV-HIV/AIDS até o ano de 2008, com uma prevalência média de 7% de coinfectados (Figura 4).

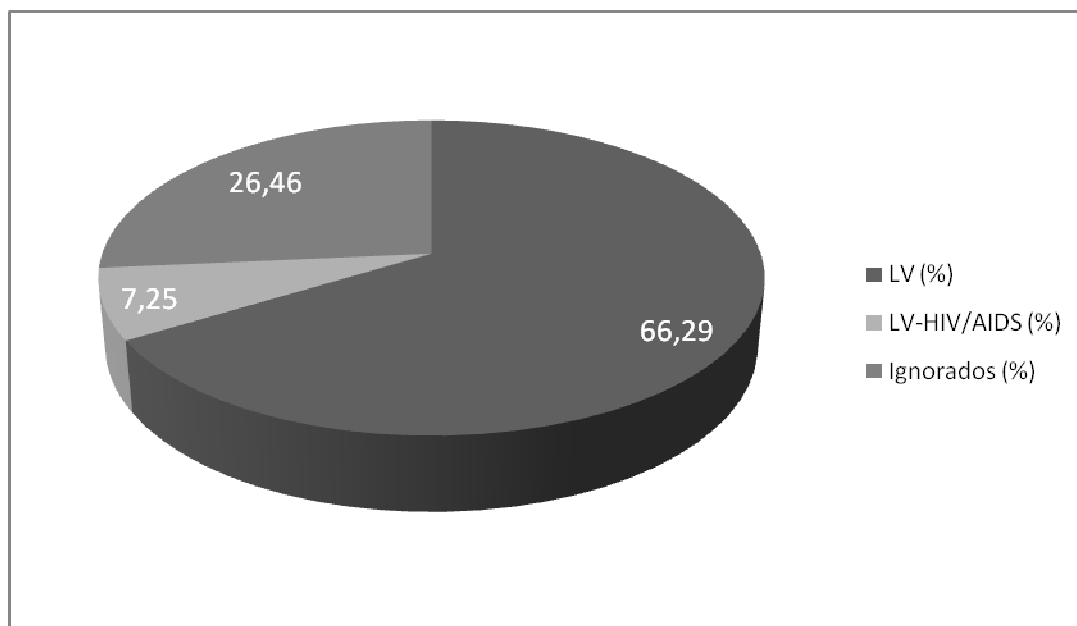


Figura 3 – Distribuição por percentual dos casos confirmados de LV, de acordo com a disponibilidade do resultado de sorologia para HIV (HIV negativos, HIV positivos e ignorados), no Estado de São Paulo no período de 1999 a 2010

NOTA: Em cinza escuro os casos LV; cinza claro os casos LV-HIV/AIDS; cinza médio os casos ignorados.

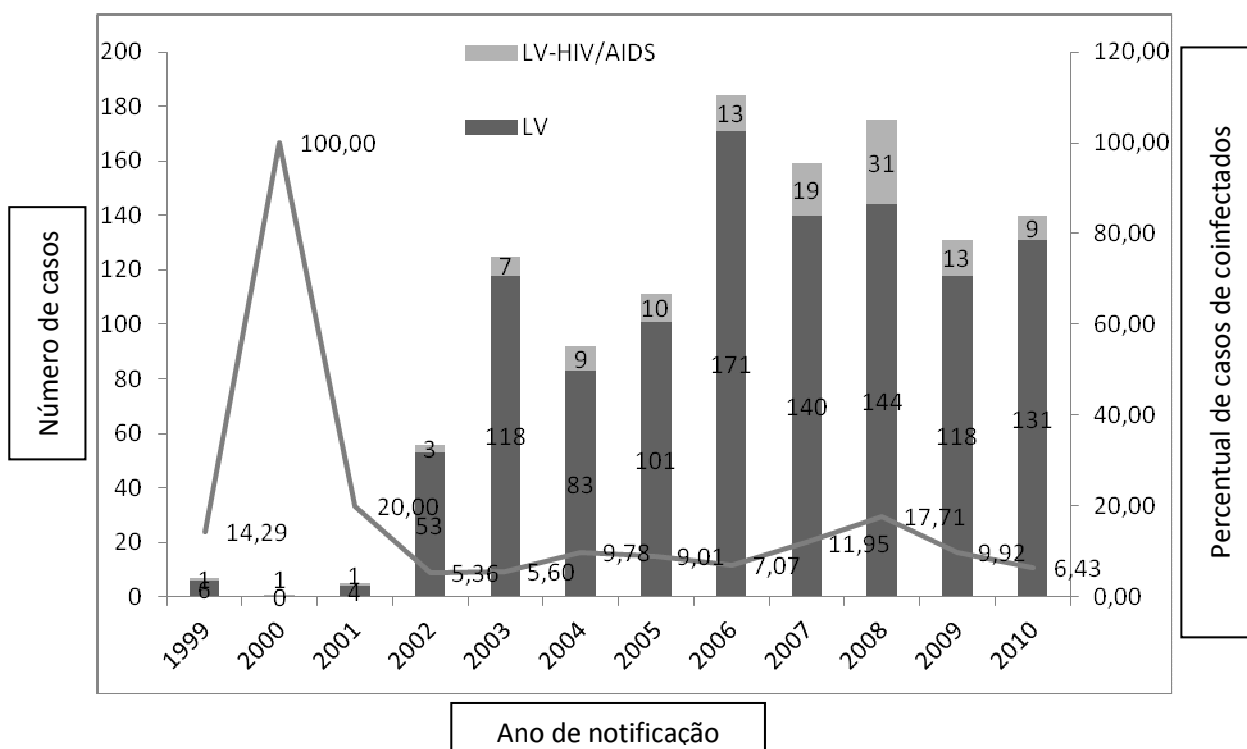


Figura 4 – Distribuição anual dos casos de LV e LV-HIV/AIDS, e percentagem de coinfectados LV-HIV/AIDS, no Estado de São Paulo no período de 1999 a 2010

NOTA: As barras verticais representam os números de casos de LV (cinza escuro) e coinfeção LV-HIV/AIDS (cinza claro) e a linha representa o percentual de casos de coinfeção LV-HIV/AIDS no total de casos LV.

Com o objetivo de avaliar a evolução dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS e comparar com a evolução dos pacientes com LV HIV-negativos, foram incluídos na análise somente os casos que tinham disponível a condição sorológica para HIV, ou seja, 1187 casos – 117 HIV-positivos e 1070 HIV-negativos.

1) *Características demográficas dos casos de LV-HIV/AIDS e LV*

a) *Faixa Etária*

Observou-se que na faixa etária até os 10 anos há maior concentração de casos de LV total (501/1187 – 42,20%), sendo que apenas quatro pacientes eram coinfectados com HIV (4/501 – 0,8%) e 497 eram HIV-negativos (497/501 – 99,2%). As faixas etárias entre 31 a 40 anos e de 41 a 50 anos concentraram juntas 271 casos de LV total, sendo 189 (69,74%) de LV e 82 (30,26%) de coinfectados LV-HIV/AIDS, mostrando um maior número de casos de HIV-positivos nessas faixas etárias em relação às demais (Figura 5).

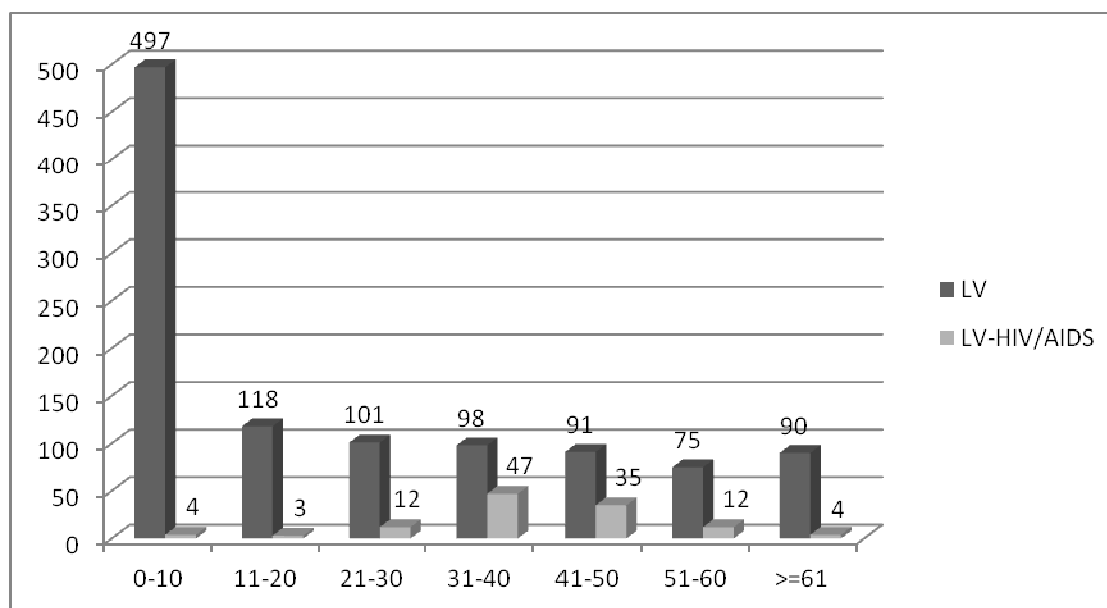


Figura 5 – Distribuição por faixa etária dos casos de LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

NOTA: As barras verticais cinza escuro representam casos LV e barras cinza claro mostram casos coinfectados LV-HIV/AIDS.

Quando se analisa somente o total de casos de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS (117 casos), observou-se que na faixa etária até 10 anos há 3,42% (4/117)

dos casos e que entre 31 a 50 anos de idade ocorrem 82 casos, o que corresponde a 70% do total dos casos de coinfeção no período estudado (figura 6).

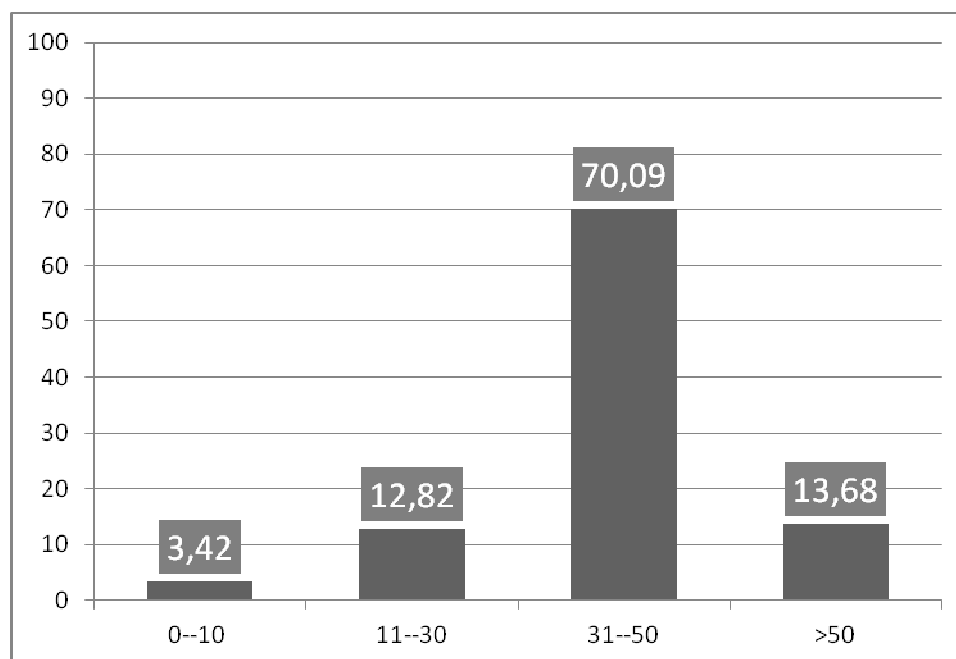


Figura 6 – Distribuição por percentual dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS de acordo com a faixa etária, no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

b) Sexo

A maioria dos casos de LV total foi do sexo masculino (729/1187 – 61,41%). Quando se analisa somente os casos de coinfectados LV-HIV/AIDS, observou-se que 72,65% (85/117) eram do sexo masculino, enquanto nos casos HIV negativos essa porcentagem foi menor (60,19% - 644/1070), com diferença significativa entre os sexos apenas nos casos HIV positivos ($p = 0,005$), conforme demonstrado na figura 7.

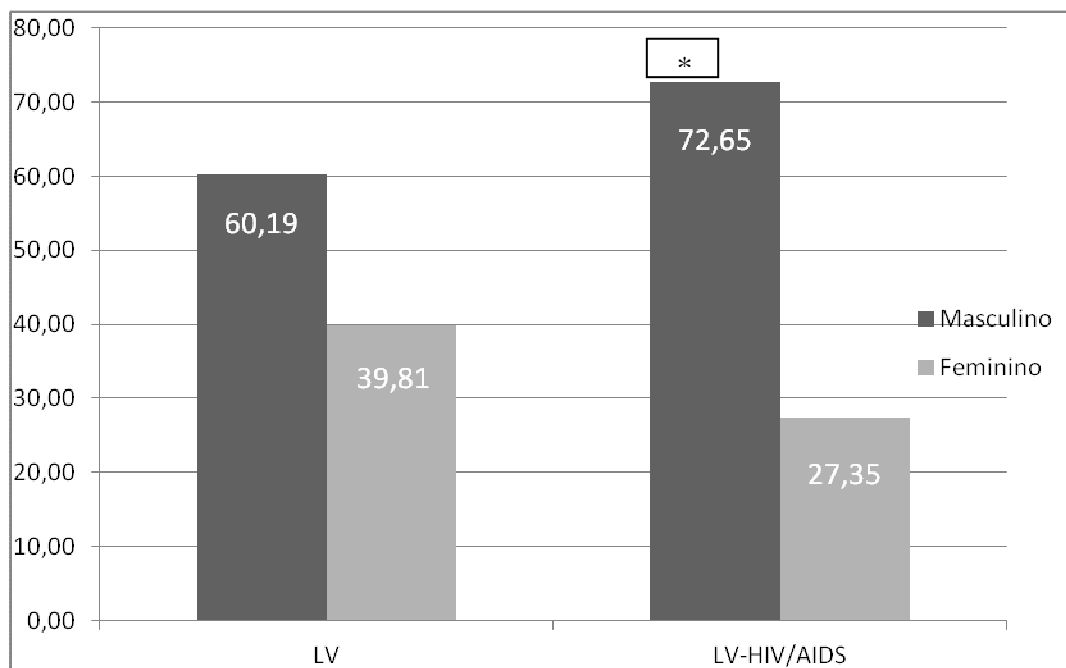


Figura 7 - Distribuição por percentual dos casos de LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS de acordo com o sexo, no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

NOTA: Barras cinza escuro representam o sexo masculino e o sexo feminino está representado pelas barras cinza claro. * $p = 0,005$ (Qui-quadrado).

Na faixa etária abaixo dos 10 anos (na qual se concentrou a maioria dos casos de LV em HIV-negativos), encontrou-se 272 pacientes do sexo masculino e 275 do sexo feminino, numa proporção de quase 50% para ambos os sexos. Já na faixa entre 31 a 50 anos (maioria dos coinfectados LV-HIV/AIDS), encontraram-se 269 pacientes do sexo masculino e 101 do sexo feminino, mostrando maior destaque para o sexo masculino nessa faixa etária.

c) Raça ou cor

Quanto à raça, foram obtidas informações de 1138 casos do total de 1187, sendo 1030 casos HIV negativos e 108 HIV-positivos. Em ambos os grupos ocorre maior percentual da raça branca, sendo 677 (65,73%) no grupo HIV-negativo e 69 (63,89%) no grupo de coinfectados LV-HIV/AIDS, não havendo diferença entre as raças quando os dois grupos foram comparados (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição por raça dos casos de LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

RAÇA/COR	LV	(%)	LV-HIV/AIDS	(%)	p valor
Branca	677	65,73	69	63,89	0,701
Negra	117	11,36	16	14,81	0,287
Indígena	1	0,10	0	0,00	0,905
Amarela	15	1,46	0	0,00	0,221
Parda	220	21,36	23	21,30	0,987
TOTAL	1 030		108		

Qui-quadrado/Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

2) Avaliação clínica e resposta terapêutica

Após a descrição demográfica dos casos, avaliou-se a evolução clínica e a resposta terapêutica, dos 1187 casos detalhados no estudo descritivo, com intuito de determinar as manifestações clínicas mais comuns nos grupos de coinfectados LV-HIV/AIDS e no grupo de LV HIV-negativo, bem como avaliar o desfecho do caso (cura, recidiva e óbito) comparando os dois grupos.

a) Características Clínicas

Quanto à sintomatologia, observou-se que a tríade “febre, hepatomegalia e esplenomegalia” está presente tanto no grupo HIV-positivo quanto no grupo HIV-negativo, sendo mais pronunciada no segundo, com diferença significativa (febre $p = 0,000$ e esplenomegalia $p = 0,008$). Tosse, fraqueza e emagrecimento foram mais pronunciados no grupo HIV-positivo, com diferença significativa (tosse $p = 0,007$, fraqueza $p = 0,000$ e emagrecimento $p = 0,001$). Hepatomegalia foi semelhante em ambos os grupos ($p = 0,242$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

	LV	(%)	LV-HIV/AIDS	(%)	p valor
SINAIS/SINTOMAS					
Febre	1006	94,02	100	85,47	0,000
Hepatomegalia	803	75,05	82	70,09	0,242
Esplenomegalia	942	88,04	93	79,49	0,008
Tosse	465	43,46	66	56,41	0,007
Fraqueza	799	74,67	107	91,45	0,000
Emagrecimento	735	68,69	103	88,03	0,001
TOTAL	1070		117		

Qui-quadrado ($p < 0,05$)

b) Desfecho (cura, recidiva, óbito)

A avaliação do desfecho entre os grupos LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS e a relação com a resposta ao tratamento às diferentes drogas utilizadas no tratamento da LV mostrou uma maior letalidade e recidiva no grupo HIV-positivo do que no grupo HIV-negativo. Comparando-se a letalidade total, observou-se uma taxa de 24,2% (23/95) no grupo HIV-positivo, enquanto entre os HIV-negativos foi de 8,2% (88/1078). A recidiva foi de 10,5% (10/95) nos coinfectados LV-HIV/AIDS e de 1,8% (19/1078) nos HIV-negativos (Tabela 3).

Nesse ponto, foram utilizados 95 casos de coinfectados LV-HIV/AIDS e 1078 eventos de LV notificados, cujos tratamentos e desfechos foram informados.

Tabela 3 – Letalidade e recidiva nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHO	LV	LV-HIV/AIDS	p valor
Óbitos (n; %)	88/1078 (8,2)	23/95 (24,2)	0,000
Recidivas (n;%)	19/1078 (1,8)	10/95 (10,5)	0,000

Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Quando os óbitos são analisados separadamente por faixa etária, observa-se maior letalidade naqueles com 51 anos ou mais nos HIV-negativos, enquanto que nos HIV-positivos há maior letalidade na faixa entre 31 a 50 anos (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos óbitos por faixa etária nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

	LV	LV-HIV/AIDS	p valor
FAIXA ETÁRIA	N=88 (%)	N=23 (%)	
1 a 10	20 (22,8)	2 (8,7)	0,160
11 a 30	11 (12,5)	2 (8,7)	1,000
31 a 50	23 (26,1)	17 (73,9)	0,000
51+	34 (38,7)	2 (8,7)	0,006
TOTAL	88/1078 (8,2)	23/95 (24,2)	0,000

Qui-quadrado/Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

Quando as recidivas são analisadas separadamente por faixa etária, observa-se maior concentração naqueles até 10 anos nos HIV-negativos enquanto que nos HIV-positivos estão mais concentradas na faixa entre 31 a 50 anos (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das recidivas por faixa etária nos pacientes com LV (HIV-negativos) e coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

	LV	LV-HIV/AIDS	<i>p</i> valor
FAIXA ETÁRIA	N=19 (%)	N=10 (%)	
1 a 10	8 (42,17)	0 (0,0)	0,030
11 a 30	4 (21,1)	2 (20)	1,000
31 a 50	1 (5,3)	6 (60)	0,003
51+	6 (31,6)	2 (20)	0,670
TOTAL	19/1078(1,8)	10/95 (10,5)	0,005

Qui-quadrado/Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

c) Resposta ao tratamento anti-Leishmania em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS

Com o objetivo de avaliar a resposta terapêutica para LV em pacientes com infecção pelo HIV, foi realizada análise somente do grupo de coinfectados LV-HIV/AIDS. Foram recuperados 115 tratamentos entre os 117 coinfectados LV-HIV/AIDS. No entanto, como se pretendia avaliar a resposta frente ao desfecho, foram analisados 101 indivíduos cujo desfecho também foi descrito.

De acordo com as drogas utilizadas para tratamento da LV, 35,64% (36/101) foram tratados com antimônio pentavalente (Sb^{V+}), 58,41% (59/101) com formulações de anfotericina B e 5,94% (6/101) com outras drogas (Figura 8), conforme discriminado adiante. Dos seis pacientes tratados com outras drogas, não havia descrição da droga utilizada nos bancos de dados disponíveis e as análises passaram a ser realizadas com uma amostra de 95 casos, nos quais havia nomeação da droga utilizada.

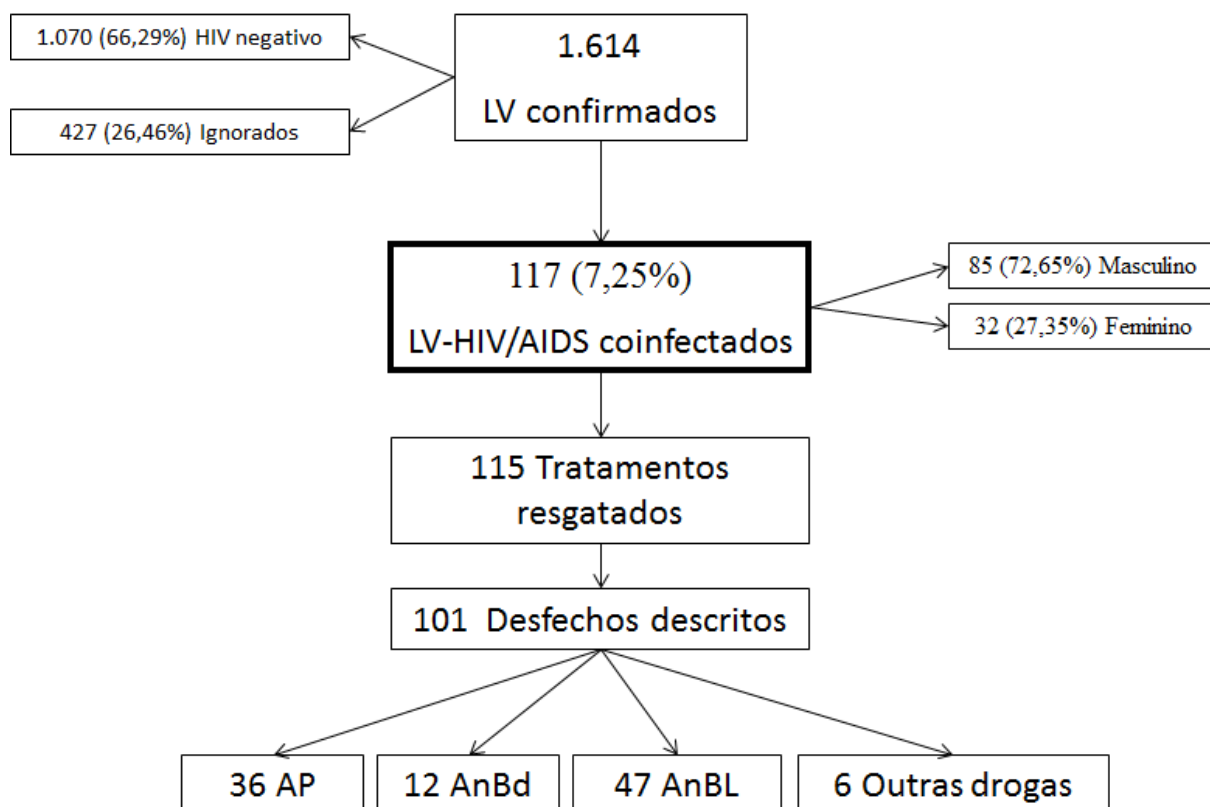


Figura 8 – Fluxograma dos casos de coinfectados LV-HIV/AIDS tratados no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

NOTA: AP= Antimonial Pentavalente, AnBd= Anfotericina B deoxicolato, AnBL= Anfotericina B Liposomal.

Na tabela 6, demonstraram-se as características demográficas e clínicas dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS de acordo com as drogas utilizadas para tratamento, na qual se observou uma semelhança entre os grupos de tratamento entre si e com as características gerais dos coinfectados LV-HIV/AIDS apresentadas anteriormente, ou seja, adultos jovens, do sexo masculino e da raça branca predominaram em todos os grupos. Fraqueza e emagrecimento foi mais presente no grupo tratado com anfotericina B lipossomal em relação aos demais grupos.

Tabela 6 – Características demográficas e clínicas, de acordo com a terapêutica anti-*Leishmania* utilizada, de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.[†]

CARACTERÍSTICAS	AP (%) N=36	AnBd (%) N=12	AnBL (%) N=47
<i>Faixa Etária</i>			
0-10	0 (0,0)	1 (8,3)	3 (6,3)
11-20	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,2)
21-30	2 (5,6)	2 (16,7)	4 (8,4)
31-40	17 (47,4)	4 (33,4)	16 (34,0)
41-50	10 (27,8)	3 (25,0)	14 (29,8)
>50	7 (19,5)	2 (16,7)	8 (17,0)
Mediana (anos)	40	34	40
<i>Sexo</i>			
Masculino	25 (69,4)	10 (83,3)	32 (68,1)
Feminino	11 (30,6)	2 (16,7)	15 (31,9)
<i>Raça</i>			
Branca	23 (63,9)	8 (66,7)	28 (59,6)
Negra	5 (13,9)	3 (25,0)	5 (10,6)
Parda	4 (11,1)	1 (8,3)	12 (25,5)
Ignorada	4 (11,2)	0 (0,0)	2 (4,2)

[†] Continua

CARACTERÍSTICAS	AP (%) N=36	AnBd (%) N=12	AnBL (%) N=47
<i>Manifestações Clínicas</i>			
Febre	33 (91,7)	11 (91,7)	40 (85,1)
Fraqueza	32 (89,2)	11 (91,7)	46 (97,9)
Emagrecimento	30 (83,3)	10 (83,3)	44 (93,6)
Hepatomegalia	22 (61,1)	10 (83,3)	31 (66,0)
Esplenomegalia	28 (77,8)	9 (75,0)	10 (74,5)
Tosse	24 (66,7)	8 (66,7)	27 (57,4)

AP = Antimonial Pentavalente, AnBd = Anfotericina B desoxicolato, AnBL = Anfotericina B Lipossomal

c.1) Tratamento com Antimonial Pentavalente

Dos 36 casos (35,6%) tratados inicialmente com antimonial pentavalente, 29 (80,80%) eram adultos jovens, com idade entre 21-50 anos, 69,44% (25/36) eram do sexo masculino e 63,88% (23/36) eram da raça branca. A cura inicial foi observada em 69,44% (25/36), falha inicial de 11,11% (4/36), letalidade 16,66% (6/36) e a recidiva 2,77% (1/36).

c.2) Tratamento com Anfotericina B deoxicolato

Dos 12 casos tratados com anfotericina B deoxicolato, nove (75,10%) eram adultos jovens, sendo 83,33% (10/12) do sexo masculino e 66,66% (8/12) da raça branca. A cura foi observada em 41,66% (5/12), falha em 16,66% (2/12), letalidade 41,66% (5/12). Não houve recidiva neste grupo.

c.3) Tratamento com Anfotericina B lipossomal

Dos 47 casos tratados com anfotericina B lipossomal, 72,20% (34/47) dos pacientes eram adultos jovens, sendo 68,08% (32/47) do sexo masculino e 59,57%

(28/47) da raça branca. Cura foi observada em 63,82% (30/47), letalidade de 21,27% (10/47), recidiva de 14,89% (7/47). Não houve falhas nesse grupo de tratamento.

Observou-se que, independente da droga utilizada, quando se compara desfechos positivos (curas) com os desfechos negativos (falhas, óbitos e recidivas), houve diferença significativa entre eles, favorecendo os desfechos positivos ($p = 0,0005$ – Teste Exato de Fisher) (Tabela 7). Mesmo quando se compara as curas com os desfechos negativos em separado, ainda assim se obteve diferença significativa em favor das curas ($p < 0,0001$ – Qui-quadrado) (Tabela 8). Contudo, quando se comparou os desfechos positivos e negativos em relação às drogas independentes, não houve diferença significativa em relação ao desfecho ($p = 0,2229$ – Qui-quadrado) (Tabela 9).

Tabela 7 - Avaliação da resposta ao tratamento anti-*Leishmania*, de acordo com desfechos positivos e negativos, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHO	No	(%)
Positivo	60	63,16
Negativo	35	36,84
TOTAL	95	100

Teste Exato de Fisher ($p = 0,0005$)

Desfechos Positivos = Curas; Desfechos Negativos = Óbitos, Falhas e Recidivas.

Tabela 8 - Avaliação da resposta ao tratamento anti-*Leishmania*, separado por desfecho apresentado, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHO	No	(%)
Curas	60	63,16
Falhas	6	6,31
Óbitos	21	22,10
Recidivas	8	8,42
TOTAL	95	100

Qui-quadrado ($p < 0,0001$)

Tabela 9 – Comparação de desfechos positivos e negativos da resposta ao tratamento anti-*Leishmania*, separados por droga utilizada no tratamento, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHO	AP (%)	AnBd (%)	AnBL (%)
Positivos	25 (69,44)	5 (41,66)	30 (63,82)
Negativos	11 (30,55)	7 (58,33)	17 (36,17)
TOTAL	36 (100)	12 (100)	47 (100)

Qui-quadrado ($p = 0,2229$)

Desfechos Positivos = Curas; Desfechos Negativos = Óbitos, Falhas e Recidivas.

AP= Antimonial Pentavalente, AnBd = Anfotericina B desoxicolato, AnBL = Anfotericina B Lipossomal

Ao se analisar os desfechos separadamente com a utilização de diferentes drogas no tratamento de LV em pacientes coinfectados com HIV, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com antimonial pentavalente,

anfotericina B lipossomal e anfotericina B deoxicolato em relação à cura, letalidade e recidiva. Apenas a falha terapêutica mostrou diferença significativa para o grupo tratado com AnBL, o qual não apresentou falhas (Tabela 10), quando comparado aos grupos tratados com AP e AnBd. Observamos que não há diferença entre os grupos AP e AnBL ($p = 0,223$) em relação à cura. Quando analisamos falha terapêutica, observamos diferença significativa entre o grupo AnBL comparado aos demais ($p = 0,034$). Em relação aos óbitos, não há diferença entre os grupos AP e AnBL ($p = 0,192$) e em relação à recidiva, também não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento ($p = 0,076$).

Tabela 10 – Avaliação da resposta ao tratamento anti-*Leishmania*, separados por droga utilizada e por desfecho apresentado, em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHO	AP (%)	AnBd (%)	AnBL (%)	*p valor
Curas	25 (69,44)	5 (41,66)	30 (63,82)	0,223
Falhas	4 (11,11)	2 (16,66)	0 (00,00)	0,034
Óbitos	6 (16,66)	5 (41,66)	10 (21,27)	0,192
Recidivas	1 (2,77)	0 (0,00)	7 (14,89)	0,076
TOTAL	36 (100%)	12 (100%)	47 (100%)	

* Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. ($p < 0,05$)

AP= Antimonial Pentavalente, AnBd = Anfotericina B desoxicolato, AnBL= Anfotericina B Lipossomal.

d) Contagem de linfócitos, carga viral e terapia antirretroviral de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS

Em relação à contagem de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e carga viral do HIV, havia disponível nos vários bancos de dados analisados (SISCEL, CVE/SES/SP e SINAN/SINANNET) dados somente de 32 dos 101 pacientes, cujos tratamentos estiveram informados. Analisando por desfecho, observou-se que a mediana de linfócitos T CD4⁺ [intervalo mínimo e máximo] e T CD8⁺ [intervalo mínimo e máximo] foi de 135 [13-684] e 550 [165-1652] para as curas e de 28,5 [4-967] e 244,5 [81-1049] para os óbitos, respectivamente. Apenas de um dos oito pacientes que apresentaram recidiva se obteve a contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (37 e 346, respectivamente).

Para a carga viral, foram documentados resultados de quatro pacientes entre as recidivas. A mediana da carga viral foi de 27.197 [50-1.000.000], 50 [50-1.000.000] e 3.133 [2.972-56.164] para curas, óbitos e recidivas, respectivamente (Tabela 11). Nota-se que não houve diferença significativa entre os desfechos (curas, óbitos ou recidivas), quando analisados linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral do HIV.

Tabela 11 – Comparativo entre contagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral (medianas) de coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

DESFECHOS	Curas (n=15)	Óbitos (n=6)	Recidivas (n=4)	p valor¹
LT-CD4⁺	135	28,5	37*	0,1071
[intervalo]	[13-684]	[4-967]		
LT-CD8⁺	550	244,5	346*	0,2510
[intervalo]	[165-1652]	[81-1049]		
Carga Viral	27.197	50	3.133	0,3153
[intervalo]	[50-1.000.000]	[50-1.000.000]	[2.972-56.164]	

¹Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. ($p < 0,05$)

*Apenas um paciente encontrado

LT= Linfócitos T

Em relação à terapia antirretroviral (TARV), foram obtidos dados de 22 pacientes, sendo que 19,11% (13/68), 17,39% (4/23) e 50% (5/10) estavam em uso de TARV quando dos desfechos: curas, óbitos e recidivas, respectivamente, mostrando que não há diferença entre os grupos (tabela 12).

Tabela 12 - Porcentagem de pacientes em uso de TARV, de acordo com os desfechos apresentados em coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.

	Curas (N=60)	Óbitos (N=23)	Recidivas (N=10)	p valor*
TARV % (casos)	19,11 (n=13)	17,39 (n=4)	50,00 (n=5)	0,1068

*Qui-quadrado ($p < 0,05$)

TARV= Terapia Antirretroviral

Estudo analítico

Após estudo descritivo e análise do tratamento anti-*Leishmania* e antirretroviral, realizou-se uma análise bivariada, tendo como desfecho final “cura” ou “óbito”, comparando faixa etária, sexo, raça, manifestações clínicas e droga utilizada no tratamento anti-*Leishmania* no grupo de pacientes com LV/HIV-AIDS (tabela 13).

Observou-se que não houve diferença entre os desfechos “curas” e “óbitos”, de acordo com as faixas etárias apresentadas ou sua mediana em anos, assim como quanto ao sexo, a raça e manifestações clínicas. Em relação às drogas utilizadas para tratamento, observou-se que o grupo tratado com anfotericina B deoxicolato teve maior mortalidade em comparação com as demais, com diferença significativa ($p = 0,03$). Nota-se um aumento no número absoluto de curas (60 para 72) e de óbitos (21 para 23), tendo em vista que estes 14 casos a mais se referem às falhas (6 curas) e recidivas (6 curas e 2 óbitos) analisadas em separado anteriormente. Não foi possível obter outras variáveis já associadas com risco de óbito por LV, tais como, icterícia, sangramentos ou presença de comorbidades, devido às limitações dos bancos de dados pesquisados, pois houve modificação no sistema de informação durante o período do estudo a partir do ano de 2007.

Tabela 13 - Análise bivariada dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS segundo evolução (cura, óbito), no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010.[‡]

CARACTERÍSTICAS	Curas (%) (N=72)	Óbitos (%) (N=23)	IC 95%	<i>p</i> valor
FAIXA ETÁRIA				0,55 ^a
0-10	2 (2,8)	2 (8,7)		
11-20	2 (2,8)	0 (0,0)		
21-30	6 (8,3)	2 (8,7)		
31-40	28 (38,9)	9 (39,1)		
41-50	19 (26,4)	8 (34,8)		
>50	15 (20,8)	2 (8,7)		
Mediana (anos)	40	40		0,74 ^b

[‡] Continua

CARACTERÍSTICAS	Curas (%) (N=72)	Óbitos (%) (N=23)	IC 95%	<i>p</i> valor
SEXO			<i>0,15-1,94</i>	<i>0,35^a</i>
Masculino	49 (68,1)	15 (78,3)		
Feminino	23 (31,9)	5 (21,7)		
RAÇA				<i>0,16^a</i>
Branca	41 (56,9)	18 (78,3)	<i>0,65-1,00</i>	<i>0,07^c</i>
Negra	12 (16,7)	1 (4,3)	<i>0,58-196,50</i>	<i>0,17^c</i>
Parda	13 (18,1)	4 (17,4)	<i>0,28-4,93</i>	<i>1,00^c</i>
Ignorada	6 (8,3)	0 (0,0)		
MANIFESTAÇÕES				
CLÍNICAS	65 (90,3)	19 (82,6)	<i>0,38-8,64</i>	<i>0,45^d</i>
Febre	66 (91,7)	23 (100,0)	<i>0,00-4,65</i>	<i>0,57^d</i>
Fraqueza	62 (86,1)	22 (95,7)	<i>0,01-3,46</i>	<i>0,67^d</i>
Emagrecimento	46 (63,9)	17 (73,9)	<i>0,11-1,77</i>	<i>0,24^d</i>
Hepatomegalia	55 (76,4)	17 (73,9)	<i>0,20-3,50</i>	<i>1,00^d</i>
Esplenomegalia	44 (61,1)	15 (65,2)	<i>0,24-2,40</i>	<i>0,65^a</i>
Tosse				
DROGA UTILIZADA				<i>0,08^a</i>
Antimonial Pentavalente	29 (40,3)	7 (30,4)	<i>0,52-4,99</i>	<i>0,40^c</i>
Anfotericina B	6 (8,3)	6 (26,1)	<i>0,06-1,11</i>	<i>0,03^c</i>
deoxicolato	37 (51,4)	10 (43,5)	<i>0,48-3,99</i>	<i>0,51^c</i>
Anfotericina B lipossomal				

Obs: Os percentuais foram calculados em relação à coluna de curas (n = 72 = 100%) e óbitos (n = 23 = 100%).

^a Qui-quadrado; ^b ANOVA (Teste de comparação de médias); ^c Comparando com os demais; ^d Teste exato de Fisher

Distribuição espacial dos casos de LV e LV-HIV/AIDS

Nesse ponto do estudo, pretendeu-se mostrar espacialmente a distribuição dos casos de LV e LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010. Observou-se que os casos de LV (HIV-negativos) localizam-se nas regiões de Araçatuba, Marília, Bauru, Presidente Prudente e Presidente Venceslau (Figura 9), e que os coinfectados LV-HIV/AIDS estão distribuídos nas regiões de Araçatuba, Marília e Bauru (Figura 10), ambos na região noroeste do Estado de São Paulo. Quando se pontua os óbitos por LV, demonstrou-se que esses se localizam nas regiões onde estão os casos de LV, ou seja, de Araçatuba, Marília, Bauru e Presidente Venceslau, além da área da capital do Estado (Figura 11). Em relação ao óbito dos coinfectados LV-HIV/AIDS, estes se concentram mais na região de Araçatuba (figura 12) e esteve relacionado com maior concentração de casos de LV-HIV/AIDS (figura 10).

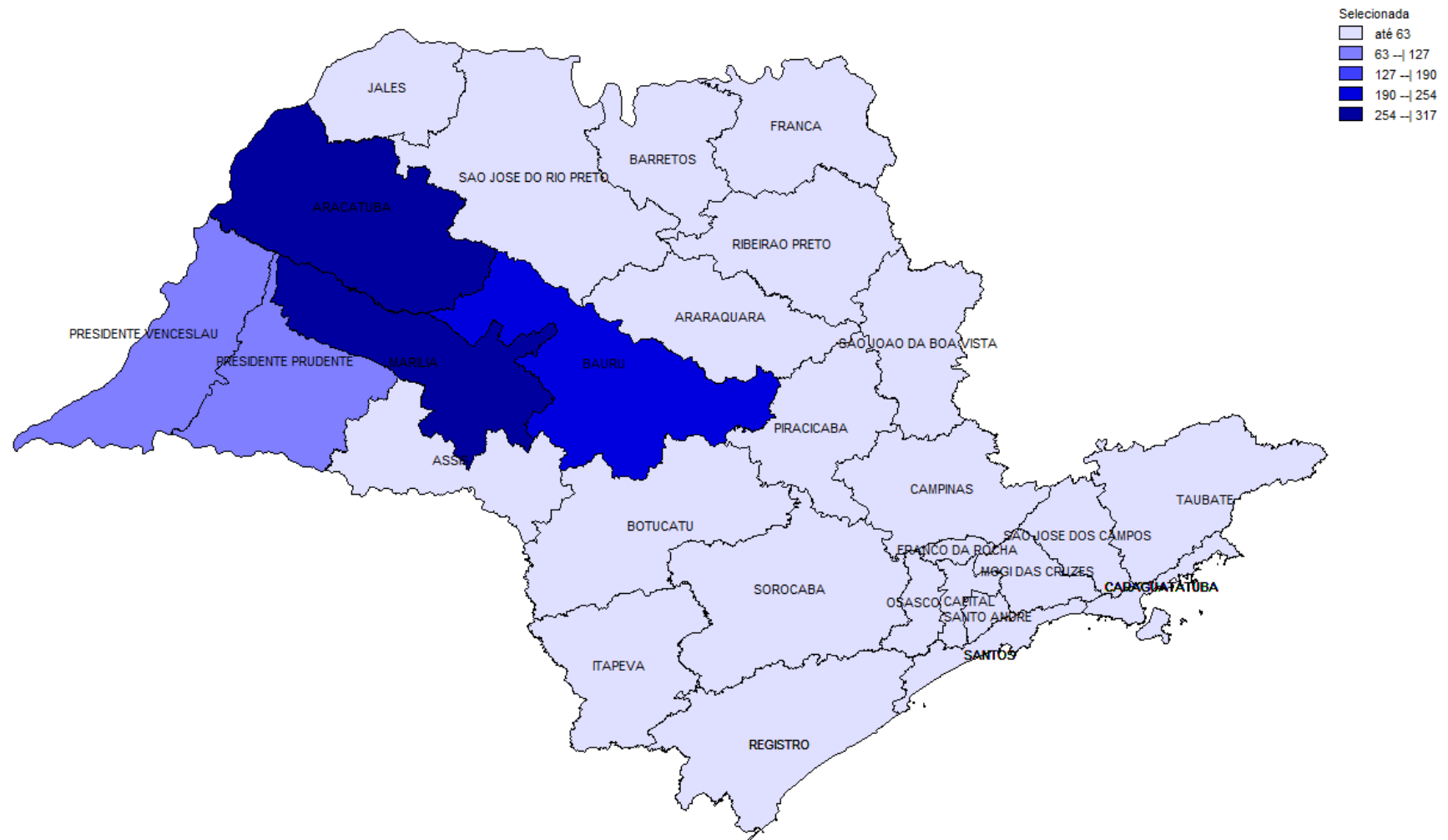


Figura 9 – Distribuição cumulativa dos casos de LV (HIV-negativo) no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

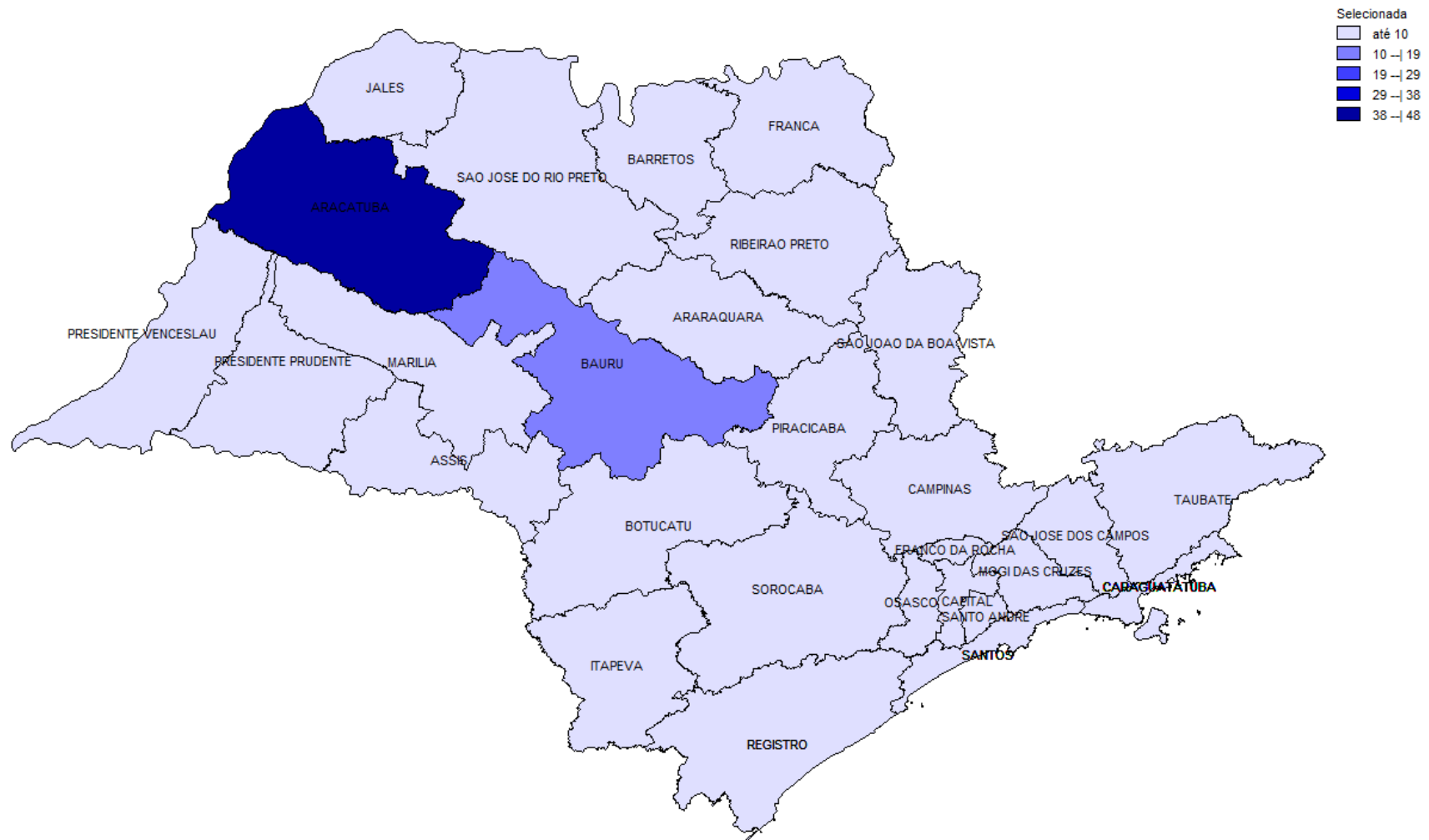


Figura 10 – Distribuição cumulativa dos casos de coinfectados LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

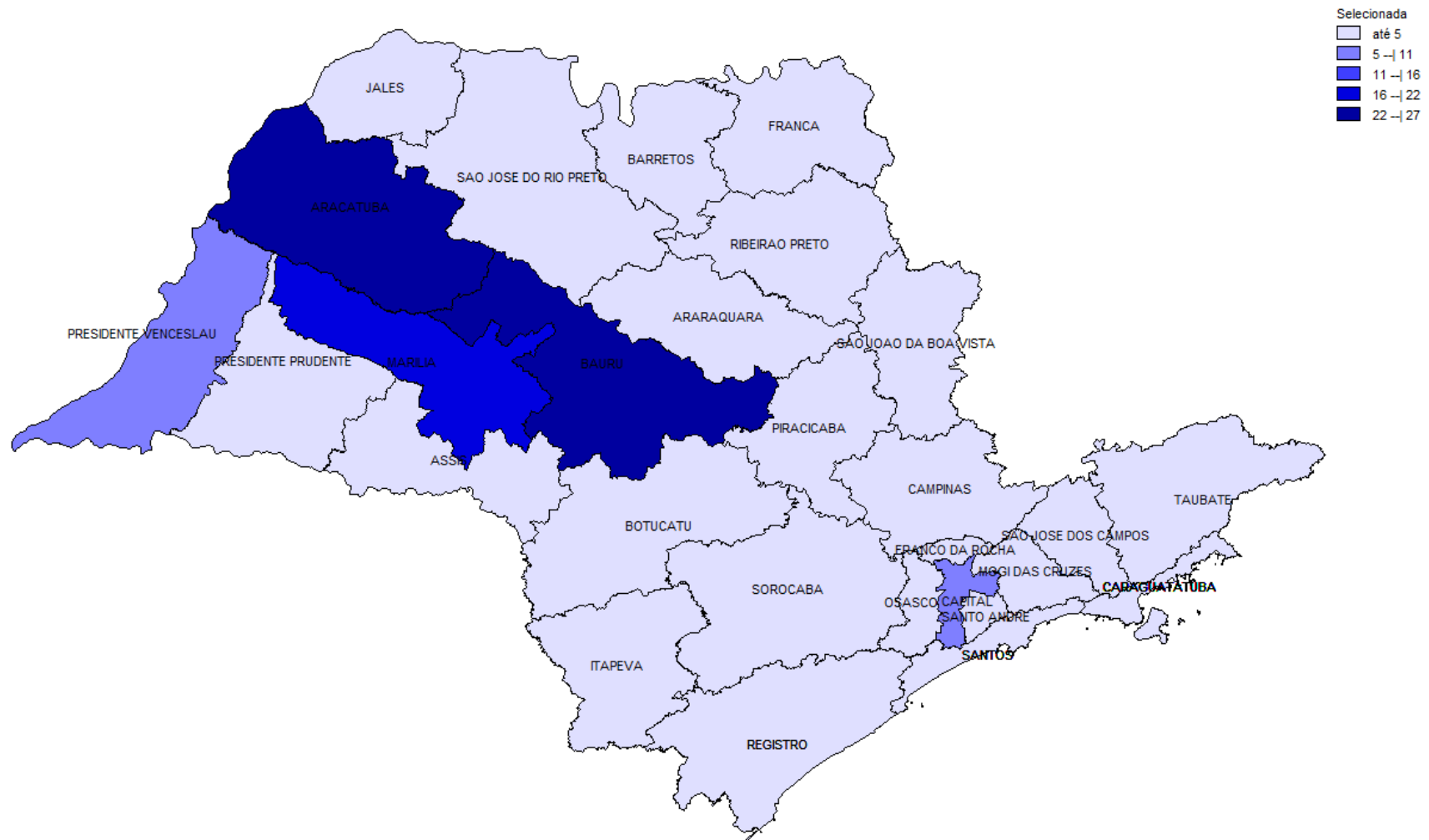


Figura 11 – Distribuição cumulativa dos óbitos de LV (HIV-negativo) no Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2010

Análise da variação genotípica de Leishmania (L.) infantum

Inicialmente, foram descritos os dados demográficos dos pacientes dos grupos LV e coinfectados LV-HIV/AIDS e observou-se uma maior prevalência da coinfecção na faixa etária de 31 a 50 anos, da raça branca e do sexo masculino, com maior letalidade e recidiva nesse grupo de coinfectados. Observou-se ainda que os casos LV e LV-HIV/AIDS se distribuem na região noroeste do Estado de São Paulo. Como também se pretendia avaliar o papel do parasito no desfecho do caso, realizou-se avaliação genotípica das cepas de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com LV e de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS.

Das 62 amostras de aspirado de medula de pacientes com diagnóstico de LV disponibilizadas pelos centros participantes, 40 tiveram seu material genético amplificado, sendo seis de pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS e 34 de pacientes somente com LV (HIV-negativos). Na Figura 13, observou-se bandas de DNA amplificado na região correspondente a 720 pb, correspondendo à banda específica de identificação de *Leishmania infantum*, de acordo com os primers utilizados.

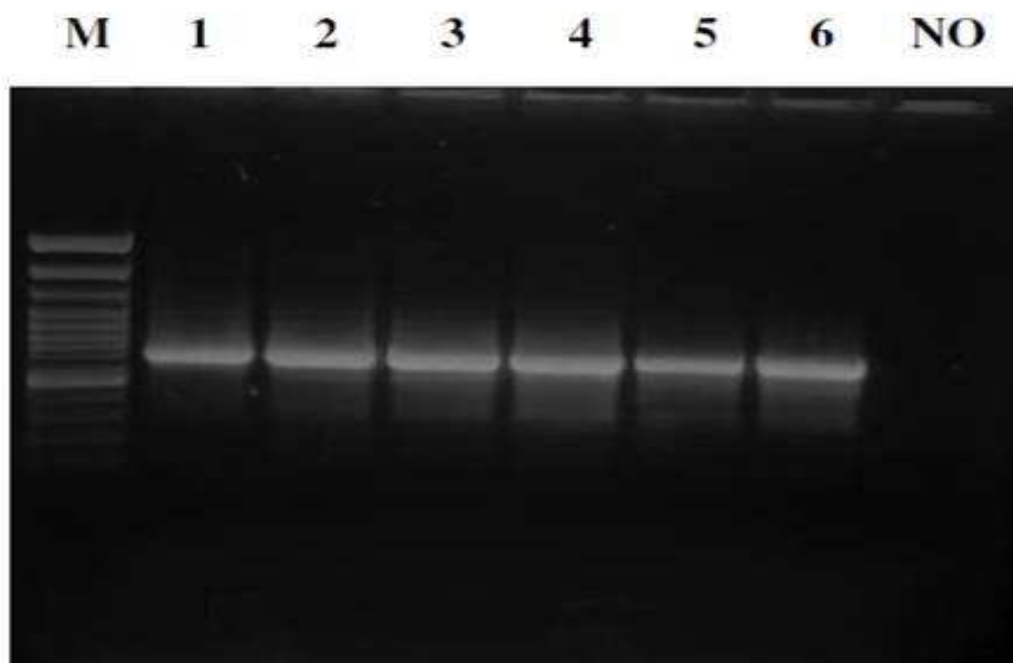


Figura 13 – Análise do produto amplificado por reação em cadeia da polimerase
NOTA: O DNA foi purificado de amostras de medula óssea de pacientes com LV e a reação de PCR ocorreu utilizando os primers LINR4 e LIN19. Produto de PCR analisado em gel de agarose 1% foi corado com GelRed 10.000x como intercalante fluorescente. (M) Padrão de peso molecular (100 pb); colunas de 1 a 6 correspondem ao produto da amplificação de 720 pb de amostras de pacientes; (NO) controle negativo.

Após a amplificação da banda de kDNA de interesse, utilizando-se os primers LINR4 e LIN19, foi realizada a análise por RFLP após digestão enzimática, usando-se as enzimas *RsaI* (Fermentas Life Science®) e *HpaII* (Thermo Scientific®), e observou-se distinção de padrões de restrição entre as amostras (Figura 14).

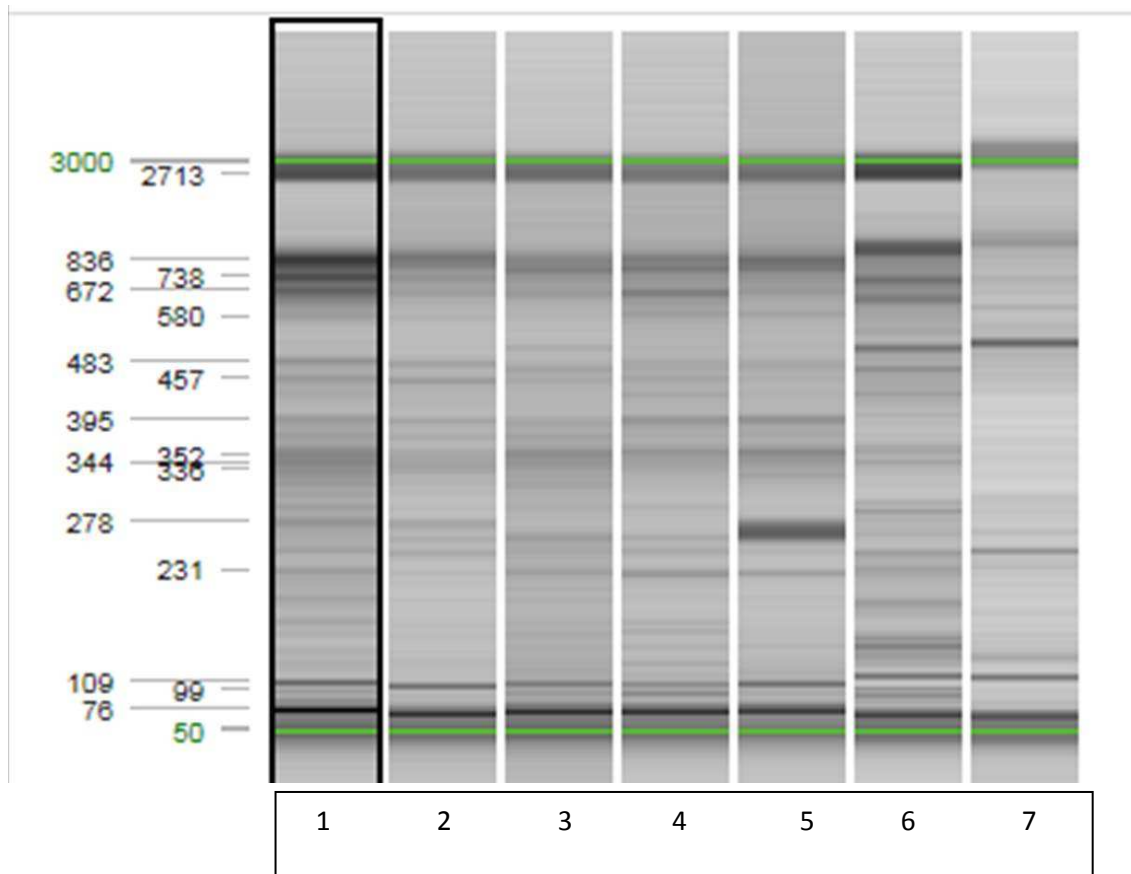


Figura 14 – Representação da eletroforese capilar após digestão com enzimas de restrição e separação por polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) de amostras de pacientes com LV

NOTA: Colunas de 1 a 7 correspondem às amostras de pacientes digeridas com enzimas de restrição *RsaI* e *HpaII*.

As bandas situadas na faixa entre 100 e 720 pb foram utilizadas na análise por RFLP, uma vez que os produtos abaixo de 100 pb poderiam ser confundidos com dímeros de primers e bandas acima de 720 pb com produtos não digeridos. A representação gráfica em forma de árvore fenética (UPGMA) construída com os dados de RFLP do kDNA das amostras de *Leishmania (L.) infantum* está representada na figura 15, na qual as 40 amostras testadas resultaram em 32 genótipos únicos. Observou-se que houve uma separação de quatro amostras (que se ramificaram em um grupo único) das 36 restantes. Contudo, não houve relação com local provável de

infecção, desfecho, infecção pelo HIV, ao se analisar essa separação. Os casos HIV-positivos distribuíram-se aleatoriamente, assim como os óbitos, os locais e ano de infecção, sexo e faixa etária. Assim, não foi possível correlacionar as amostras entre si, sejam por local provável de infecção, evolução ou coinfeção com o HIV.

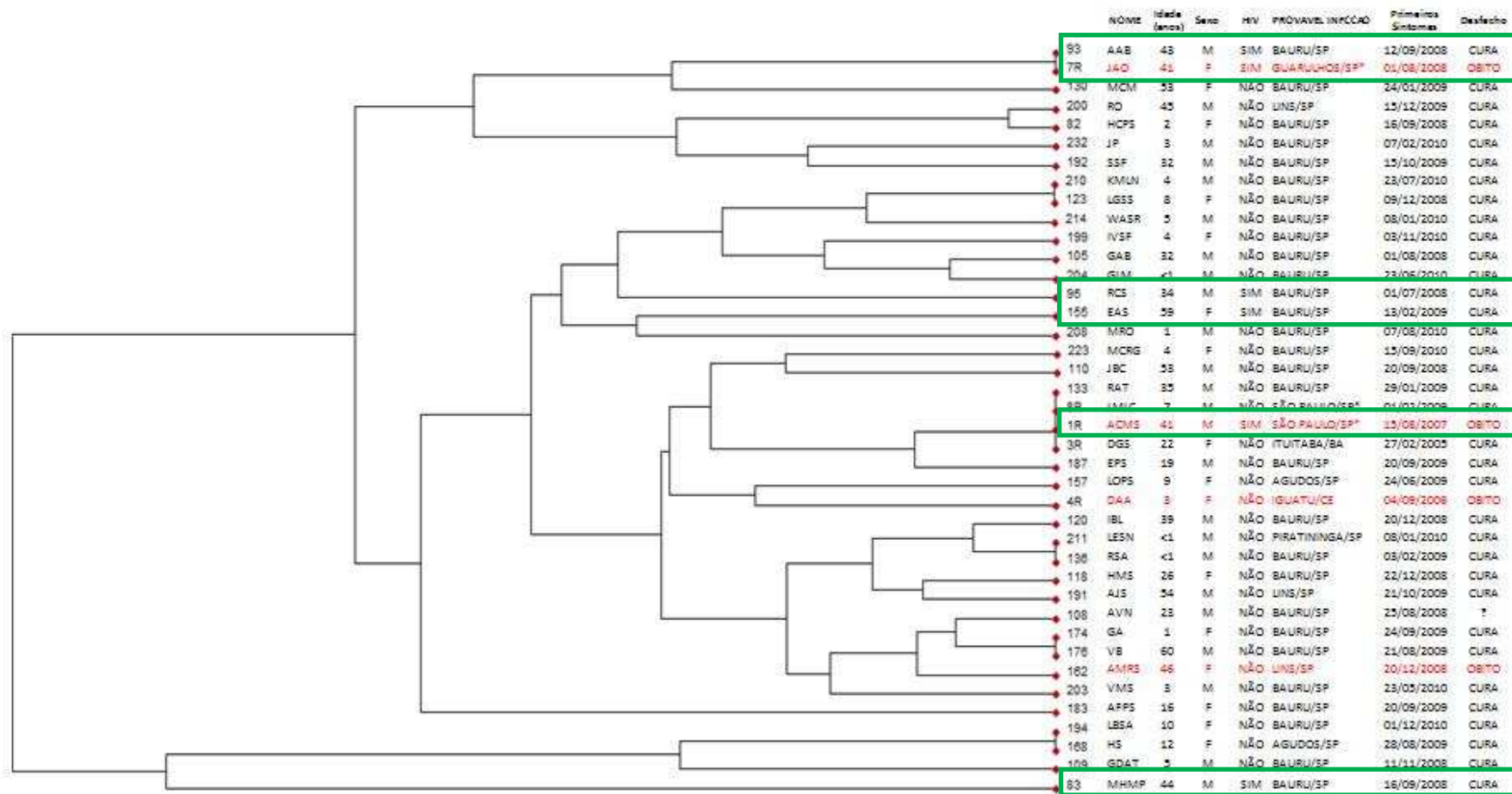


Figura 15 – Árvore fenética (UPGMA) construída com os dados de RFLP do kDNA, mostrando a distribuição de 40 isolados de *Leishmania (L.) infantum* de amostras de medula óssea de paciente com diagnóstico de LV do Estado de São Paulo
 NOTA: Ao lado, tabela informativa com idade, sexo, procedência da amostra, presença ou não de infecção pelo HIV (em verde os casos positivos), e desfecho apresentado (óbitos em vermelho).

DISCUSSÃO

O presente estudo, pioneiro sobre o tema coinfeção LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo (área de implantação recente da LV), teve como fonte principal para a coleta das informações os dados secundários de um programa de rotina epidemiológica da Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo e do Ministério da Saúde do Brasil. De 1614 casos LV confirmados parasitologicamente, 427 não tinham definição da situação sorológica para HIV (aproximadamente um quarto dos pacientes) e 16 casos de coinfeção LV-HIV/AIDS não havia descrição do desfecho em relação ao tratamento, assim esses casos foram excluídos do estudo. A perda dessas informações, de certo modo, prejudicou uma análise com maior casuística, ratificando que a obtenção de dados secundários fidedignos depende de um preenchimento adequado dos instrumentos utilizados para notificação e informação. Estas informações descritas de forma adequada servem não somente para desenvolvimento de pesquisa, mas principalmente para que sejam desencadeadas ações de prevenção e controle pelos programas de específicos.

Durante o período do estudo, observou-se o aumento progressivo do número de casos de LV, sendo 1614 casos parasitologicamente confirmados desde o primeiro caso descrito em 1999, no município de Araçatuba. Posteriormente, houve expansão para outros municípios do noroeste do Estado, abrangendo as regiões de Marília, Presidente Prudente, Bauru e Araçatuba (Madalosso *et al.*, 2012), o que ficou confirmado pelo presente estudo. Também, notou-se um aumento do número de casos de coinfeção LV-HIV/AIDS a cada ano, sendo 7,25% (117/1614) dos casos a média aproximada no período de 1999 a 2010. Por outro lado, se excluídos os 427 casos ignorados, a porcentagem de coinfectados foi de 9,8% (117/1187). Se fosse levado em conta um percentual de 9,8% de coinfeção, poder-se-ia haver uma casuística maior, com um número total aproximado de 159 casos no total de 1614. Assim, supõe-se que uma parcela desses ignorados também possam ser HIV-positivos e que tenham sido manejados incorretamente. Observa-se na literatura que uma parcela dos indivíduos HIV-positivos (16 a 20%) tem infecção assintomática por *Leishmania*, baseados em estudos sorológicos e de biologia molecular (Cruz *et al.*, 2006). Desse modo, uma

parcela dos indivíduos HIV-positivos do Estado de São Paulo também podem apresentar infecção assintomática pela *Leishmania* e não estar presente no conjunto de casos estudados, já que foram analisados apenas casos sintomáticos e com exame parasitológico positivo.

Na análise de distribuição espacial, observou-se uma concentração dos casos de LV na região noroeste do Estado, em franca expansão em direção à capital, ou seja, do oeste para o leste, desde a divisa com o Mato Grosso do Sul, passando pelas regiões dos municípios de Araçatuba, Marília e Bauru. Análise espacial e temporal indicou que a rota da expansão e da disseminação da LV seguiu um sentido oeste-leste, através de três diferentes intervenções humanas no ambiente: uma via expressa federal (BR-262) e uma ferrovia, ambas construídas no século XX, desde Bauru/SP até Corumbá/MS (divisa com a Bolívia). A terceira e mais importante intervenção antropogênica foi a construção do gasoduto Bolívia-Brasil. Essas intervenções mostraram a mesma direção e temporalidade da expansão da LV no sudoeste do Brasil, sobretudo no Estado de São Paulo, quando indivíduos de áreas endêmicas migram para outras não endêmicas, onde já se mostrava a presença do inseto vetor flebotômico (Correa Antonialli *et al.*, 2007). Outro estudo realizado no Estado de São Paulo, no qual 112 amostras teciduais de cães com LV foram analisadas quanto à diversidade genética da *Leishmania infantum* por Multilocus Microsatellite Typing (MLMT), revelou que as cepas da região noroeste do Estado de São Paulo mostravam relação com as cepas do Estado do Mato Grosso do Sul (localizado a noroeste de São Paulo), como resultado de expansão e disseminação de humanos e cães doentes provenientes do Mato Grosso do Sul, enquanto que cepas do sudeste do Estado de São Paulo formariam um novo *cluster* genético de *Leishmania infantum*, proveniente de outras regiões do Brasil ou de outros países endêmicos (Motoie *et al.*, 2013). No presente estudo, demonstrou-se também que os casos de coinfeção LV-HIV/AIDS se concentram nas áreas endêmicas para LV, ou seja, noroeste do Estado de São Paulo, e que os óbitos desses casos acompanham tal tendência. Não surpreendentemente, houve um relativo maior número de óbitos na região da capital, onde se localiza o centro de referência estadual para doenças infectocontagiosas (Instituto de Infectologia Emílio Ribas – SES/SP), motivo que deve ter contribuído para o aumento dos óbitos.

Conforme esperado e de acordo com estudos anteriores, os casos de LV distribuíram-se principalmente na faixa etária abaixo dos 10 anos de idade e os

coinfectados LV-HIV/AIDS entre 31 a 50 anos, grupo etário sexualmente ativo (no qual se encontram grande parte dos infectados pelo HIV, pois esta é a principal forma de transmissão do HIV no Brasil) e com mobilidade regional dinâmica comparando com os extremos de idade (viagens a trabalho, ecoturismo, desflorestamento para construções de estradas, etc.) (Alvar *et al.*, 1997; Desjeux *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2006; Rabello *et al.*, 2003; Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010; Madalosso *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013). Assim como em outros estudos, o sexo masculino foi mais prevalente, seja infectado pelo HIV ou não, mostrando uma maior propensão desse sexo para o desenvolvimento da LV (Evans *et al.*, 1992; Rabelo *et al.*, 2003; Desjeux *et al.*, 2003; Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2013). No sexo masculino, o qual produz hormônios androgênicos responsáveis pelas características secundárias próprias do sexo, ocorre diminuição da atividade das células NK, impedimento da produção de TNF- α e óxido nítrico pelos macrófagos e supressão da sinalização transducional de NF- κ B (envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias), mostrando uma característica imunossupressora desses hormônios androgênicos (Snider *et al.*, 2009). Assim, há uma maior produção de IL-10 no sexo masculino comparando com o feminino, havendo o desvio para um padrão humoral Th2 de resposta imune. É sabido que o padrão Th2 de resposta imune (com maior produção de IL4 e IL-10) resulta numa maior propensão à infecção e ao desenvolvimento de LV, devido inibição da ativação dos macrófagos, permitindo replicação intracelular da *Leishmania* (Saporito *et al.*, 2013). Conforme demonstrado em estudo prévio, o indivíduo do sexo masculino que desenvolve LV sintomática produz níveis ainda maiores de IL-10 quando comparado aos sintomáticos do sexo feminino ou aos controles LV assintomáticos (Monteiro *et al.*, 2013[§]). Outro fator a ser considerado como hipótese é a maior exposição ambiental do sexo masculino, seja por características culturais de vestimentas (maior área do corpo exposta ao despir-se o tronco em períodos de clima quente, permitindo picada do inseto vetor com maior facilidade), ou por exposição laboral em regiões de matas fechadas e de desmatamento (Tolezano *et al.*, 1994). Um maior número de casos foi observado na raça branca (63,89%), seguidos por pardos e negros, sem correlação com dados da literatura sobre LV e distribuição por raça/cor. Como o Estado de São Paulo possui uma população de

[§] Monteiro GR. IL-10 in the pathogenesis of visceral leishmaniasis. [Pôster apresentado no Worldleish 5, 2013; Porto de Galinhas/PE, Brasil].

maioria branca (63,91%, segundo senso demográfico de 2010), esse valor pode ter influenciado o resultado, mostrando-se por valores semelhantes (IBGE, 2010).

As manifestações clínicas da LV e da coinfeção LV-HIV/AIDS dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune celular mediada do hospedeiro, quando um padrão de resposta Th1 baseado na produção de INF-gama e IL-2 conferem proteção e resolução da infecção. O parasito afeta principalmente células da linhagem dos macrófagos, induzindo desvios na produção de hemácias, plaquetas e leucócitos, sobretudo promovendo uma queda na contagem das células T, manifestando-se clinicamente por anemia, plaquetopenia e leucopenia (Santos-Oliveira *et al.*, 2011). Em relação às características clínicas da LV, observou-se que a tríade clássica de febre e hepatoesplenomegalia foi mais prevalente nos indivíduos HIV-negativos e que sintomas como fraqueza, emagrecimento e tosse foi mais prevalente em HIV-positivos, ambos com diferença significativa, exceto hepatomegalia. Sintomas inespecíficos (fraqueza, emagrecimento e tosse) poderiam estar relacionados à própria infecção pelo HIV ou por infecções oportunistas concomitantes e estas infecções oportunistas (histoplasmose e tuberculose disseminadas, *Micobacterium avium* complex, linfoma) também poderiam estar mascarando os sintomas clássicos (febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia), dificultando o diagnóstico de LV (Desjeux *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2003; Alvar *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013). Devido a uma falha na resposta proliferativa dos macrófagos, a esplenomegalia é menos frequente nos coinfectados, conforme descrito previamente (Fernandez-Guerrero *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2005; Daher *et al.*, 2009; Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010). Vale lembrar que casos com manifestações atípicas ou incomuns (trato gastrointestinal, respiratório, cutâneo, renal, sistema nervoso central) são mais frequentes em indivíduos imunodeprimidos, como aqueles infectados pelo HIV, e que as características encontradas no Estado de São Paulo são semelhantes às aquelas descritas na literatura (Alvar *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2005; Alvar *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013).

Assim como relatado em outros estudos realizados no Brasil e no mundo, maior letalidade e recidiva foram observadas em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS do Estado de São Paulo, numa proporção de aproximadamente o triplo e o quádruplo comparando-se aos HIV-negativos, respectivamente, com diferença significativa (Alvar *et al.*, 2008; Daher *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2011; Madalosso *et al.*, 2012; Lima, *et al.* 2013; van Griensven *et al.*, 2013). Conforme descrito anteriormente, comparando

com HIV-negativos, pacientes coinfectados na Etiópia tiveram maior carga parasitária, com disseminação para locais não usuais, desfechos desfavoráveis e maior susceptibilidade à toxicidade e à resistência medicamentosa (Ritmeijer *et al.*, 2011). Sabidamente, a infecção pelo HIV aumenta o risco de adoecer por LV em 100 a 2320 vezes, permitindo o desenvolvimento e disseminação da doença e causando uma resposta negativa à terapia antirretroviral (TARV) (den Boer *et al.*, 2009; Alvar *et al.*, 2008). A infecção por *Leishmania* induz a ativação do vírus latente, acelera a multiplicação do HIV, favorecendo a entrada do vírus nas células do sistema retículo endotelial (pela maior expressão do CCR5 – correceptor de entrada do HIV nas células), integração e liberação de novos vírions (Cruz *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 1997; Alvar *et al.*, 2008; Santos-Oliveira *et al.*, 2010; Pintado *et al.*, 2001; Saporito *et al.*, 2013). Por outro lado, durante a LV ativa, observa-se supressão da resposta imune, pois o HIV dificulta a função efetora dos macrófagos ao impedir a fagocitose, a morte intracelular, a quimiotaxia e a produção de citocinas, com consequente multiplicação intracelular do parasito (Alvar *et al.*, 2008; Hailu *et al.*, 2010; Saporito *et al.*, 2013). Alta taxa de recidiva pode estar associada à inabilidade de controlar a replicação parasitária devido à dificuldade no restabelecimento do repertório de linfócitos específicos contra *Leishmania* (Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010). Pacientes HIV-positivos *per se* apresentam uma estimulação antigênica crônica por esse vírus, contribuindo para uma tempestade de citocinas em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS, também de padrão humoral de resposta imune, atingindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias similarmente à dengue e à sepse, o que contribui para a morte das células T CD4⁺ por apoptose (Santos-Oliveira *et al.*, 2011). A letalidade e a recidiva entre os coinfectados foram maiores na faixa etária entre 31 a 50 anos, na qual há maior prevalência de casos de coinfeção. Por outro lado, observou-se que os óbitos entre os HIV-negativos ocorreram em maior número naqueles acima de 50 anos, ratificando o que já havia sido demonstrado previamente no Estado de São Paulo (Madalosso *et al.*, 2012), o que chama atenção para a necessidade de um diagnóstico rápido dos casos de LV nessa faixa etária. Esses pacientes de idade mais avançada frequentemente possuem comorbidades em tratamento, o que predispõe a interações medicamentosas com as drogas anti-*Leishmania*, além de dificultar e retardar o diagnóstico da LV (Madalosso *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013).

Tendo-se observado que na coinfeção LV-HIV/AIDS há maior letalidade e recidiva, avaliou-se se a droga utilizada no tratamento da LV poderia contribuir para esse desfecho. No Brasil, três drogas estão disponíveis para o tratamento da LV: antimonial pentavalente (Sb^{V+}) e anfotericina B em suas formulações deoxicolato e lipossomal. Devido limitações nesse estudo, no qual se utilizaram dados secundários de programas de rotina epidemiológica, não foi possível afirmar categoricamente que as drogas informadas nos programas de rotina epidemiológica foram exatamente as utilizadas para tratamento dos pacientes. Entretanto, acredita-se que as drogas informadas tenham realmente sido utilizadas, assim sendo levado em consideração pelo presente estudo. Até o ano de 2006, os formulários de notificação de casos de LV (desenvolvidos para alimentação do banco de dados do SINAN) não distinguem as formulações da anfotericina B e, devido ao alto custo da formulação lipossomal, supõe-se que a grande maioria dos tratamentos era realizada com a opção deoxicolato até aquele ano. Nesse mesmo ano de 2006, a anfotericina B lipossomal foi instituída para o tratamento de casos selecionados e, no ano seguinte, os formulários tinham a distinção das duas formulações de anfotericina B, permitindo análises separadas desde então. Além dos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS, gestantes, crianças abaixo de 10 anos, adultos acima de 50 anos, transplantados, aqueles em uso de imunossupressores, falhas e recidivas eram indicados para tratamento com anfotericina B lipossomal (AnBL), de acordo com novas regras da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SUCEN/CCD/SES/SP). Desse modo, optou-se por considerar a “anfotericina B” como anfotericina B deoxicolato (AnBd) no período entre 1999 a 2006 e os dados sobre AnBL se refere praticamente aos anos entre 2007 a 2010. Adicionalmente, até o ano de 2006, a causa de óbito não era diferenciada se por LV ou por outras causas. Portanto, optou-se por atribuir todos os óbitos como se tivessem ocorridos pela LV como causa básica. No ano de 2007, com a mudança da ficha de notificação do SINAN, a causa do óbito pôde ser diferenciada, permitindo análises separadas daquele ponto em diante.

As características demográficas e clínicas dos pacientes coinfectados foram semelhantes nos três grupos de tratamento, com uma mediana de idade entre 34 a 40 anos, ou seja, dentro da faixa etária de maior prevalência dos casos. Demonstrou-se que, independente da droga utilizada para tratamento, os casos de cura foram a maioria (63,15%), com diferença significativa, seja comparado cura *versus* não cura, ou cura *versus* falha, óbito e recidiva separadamente. Quando se separou as drogas utilizadas

(antimonial pentavalente, anfotericina B deoxicolato e lipossomal) e se comparou os desfechos positivos (cura) *versus* os negativos (não cura – óbito, falha e recidiva), perdeu-se a diferença significativa. De um modo geral, os casos de cura foram mais frequentes quando tratado com antimonial pentavalente (Sb^{V+}) ou anfotericina B lipossomal, contrário ao observado com a anfotericina B deoxicolato, na qual os desfechos negativos foram maiores.

Analisando droga a droga e os desfechos separadamente, observou-se: que os pacientes tratados com antimonial pentavalente (AP) tiveram taxas de curas semelhantes àqueles tratados com AnBL; que não houve falhas quando tratados com AnBL; que a letalidade foi maior quando utilizado AnBd; e que a taxa de recidiva foi maior nos tratados com AnBL. Em todos esses resultados houve diferença significativa, exceto quando relacionado às falhas. Possivelmente, houvera vieses de seleção dos grupos de tratamento, quando os casos mais graves eram selecionados para o grupo da AnBL primariamente. Outro fator a ser considerado nessas recidivas é que a dose total terapêutica recomendada da AnBL (20 mg/Kg de peso), de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, seja possivelmente insuficiente para tratamento da *Leishmania infantum* no Brasil, assim como descrito no tratamento da *L. donovani* na Etiópia, quando a dose total de 30 mg/kg foi utilizada, mostrando igual segurança, porém muito menos efetividade ao comparar pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS com LV HIV-negativos (59,5% *versus* 92,6% de cura inicial, respectivamente) (Brasil/MS, 2011; Ritmeijer *et al.*, 2011). Assim, uma dose total maior de AnBL (30 a 40mg/kg em 6 a 10 dias de tratamento) poderia ser estabelecida para o tratamento da LV no Brasil, como já proposto em países da África Oriental e Oriente Médio (WHO, 2010). Por não se dispor de dados sobre a profilaxia secundária em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS nos banco de dados analisados, não se pôde concluir que estes pacientes tenham ou não recebido terapêutica como profilaxia secundária para LV, o que implicaria numa maior chance de recidivas.

Conforme descrito anteriormente, a anfotericina B lipossomal permite que doses mais elevadas sejam utilizadas e menos eventos adversos estejam presentes, resultando em uma maior taxa de sucesso terapêutico (Cruz *et al.*, 2006; Bern *et al.*, 2006). No geral, a tolerância à AnBL é excelente, sem interrupções de tratamento, sem falhas iniciais ao tratamento e com melhora significativa clínica e laboratorialmente. Em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS, as recaídas são esperadas somente após seis

meses de tratamento e em pacientes com baixa contagem de células T CD4⁺ (Sinha, 2011). Embora a AnBL tenha sido bem tolerada, a alta taxa global de insucesso por óbitos ou falhas no tratamento em pacientes coinfectados (38,3% em 2 anos) se compara pobremente à letalidade menor que 1% em pacientes HIV-negativos, em infectados por *L. Donovanii* na Índia (Sinha *et al.*, 2011). Outros resultados também se mostram desapontadores, pois alta mortalidade e alta taxa de recaída são observadas em pacientes LV coinfectados com HIV quando tratados com AnBL, comparando-se aos casos LV HIV-negativos (6,7% *versus* 6,4% de mortalidade, respectivamente), sugerindo uma menor sensibilidade da *L. donovani* à AnBL no leste da África (Ritmeijer *et al.*, 2011). Desse modo, observa-se que a resposta à AnBL é variável em diferentes partes do mundo.

Quanto ao maior número de desfechos negativos nos tratamentos com AnBd, supõe-se que devido à alta nefrotoxicidade dessa droga, interrupções no tratamento devido insuficiência renal tenha sido responsável pelo alto índice de óbitos e de falhas, haja vista que esta formulação é potencialmente causador de efeitos secundários graves e requer internação por quase 30 dias (Alvar *et al.*, 2008). Contudo, essa hipótese não pôde ser confirmada, pois não foi possível se obter maiores informações sobre o tratamento devido a limitações desse estudo.

No período do estudo, uma cura inicial foi alcançada em 69,44% dos pacientes coinfectados tratados com AP, e alguns tratamentos falharam (11,11%), os quais requereram mudança na terapia durante o retratamento. A melhoria clínica após tratamento com antimoniais pentavalentes não significa cura parasitária, e a taxa de recidivas em 12 meses é estimada em aproximadamente 70% na ausência de profilaxia secundária (Laguna *et al.*, 2003). Como o AP é um medicamento conhecido pela baixa eficácia e por ser mais tóxico para os pacientes HIV-positivos (de uma maneira dose-dependente), toxicidade cardíaca, renal e pancreática são responsáveis pela interrupção em 11 a 28% dos tratamentos (Cruz *et al.*, 2006; den Boer *et al.*, 2009; Alvar *et al.*, 1997; Hailu *et al.*, 2010; Alexandrino-de-Oliveira *et al.*, 2010; Cota *et al.*, 2013). Os antimoniais apresentam uma razoável taxa de cura (85-95%) em pacientes LV HIV-negativos, exceto em Bihar, na Índia, onde há relatos de resistência da *L. donovani* em cerca de 60% dos casos (den Boer *et al.*, 2009; Le Pape *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2001). A eficácia do tratamento com antimonial pentavalente depende de vários fatores (por exemplo, o estágio da doença, gestação, má nutrição, imunossupressão, toxicidade

do fármaco, etc.). Num estudo realizado na Etiópia, entre 92,9 a 100% dos pacientes HIV-negativos foram curados quando tratados com antimoniato de meglumina, enquanto que, entre os HIV-positivos tratados com essa mesma droga, apenas 58,3% obtiveram cura no final do tratamento e 33,3% mantiveram-se curados em seis meses de seguimento pós-tratamento (Hailu *et al.*, 2010). Uma revisão sistemática, a qual comparou o uso do antimonial pentavalente contra anfotericina B (deoxicolato ou formulação lipídica) em 920 episódios de LV em infectados pelo HIV, mostrou superioridade favorável aos tratados com anfotericina B em relação à mortalidade, melhora clínica e presença de menor quantidade de eventos adversos, sugerindo ser mais devido à menor toxicidade da anfotericina B em relação ao antimonial do que à maior efetividade da anfotericina B em formulações lipídicas (Cota *et al.*, 2013).

Em relação aos resultados sobre a infecção pelo HIV (contagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, carga viral do HIV e terapia antirretroviral), poucos dados estiveram disponíveis para análise entre os fornecidos pelos centros responsáveis pelo tratamento de HIV/AIDS no Estado de São Paulo e no Brasil. A maioria dos pacientes não teve seus dados registrados; talvez porque os testes não tinham sido realizados ou por falha no sistema de informação. Dos 21 óbitos e das 60 curas observadas, apenas aproximadamente 25% de ambos juntos tiveram seus dados registrados. Ainda assim, observou-se que maiores níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estavam presentes nos pacientes que evoluíram para cura e menores valores foram encontrados nos que evoluíram para óbitos e recidivas como desfecho, conforme descrito na literatura (del Giudice *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2011). Apenas um caso teve seus níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ registrados para análise entre os oito que recidivaram, o que limita ainda mais esta discussão. Do mesmo modo, poucos casos tiveram dados sobre carga viral do HIV disponível e uma apresentação mais concreta ficou prejudicada. Quando analisado os fatores de risco para LV, um Índice de Massa Corporal (IMC) < 16 kg/m², o diagnóstico concomitante de tuberculose e uma contagem de células T CD4⁺ menor que 50 células/μl são preditores de mortalidade, e uma contagem de células T CD4⁺ menor que 200 células/μl em seis meses após o tratamento da LV está associada à recidiva por LV (Sinha *et al.*, 2011). Uma revisão sistemática também identificou os fatores preditores de recaída por LV em pacientes infectados pelo HIV: não aumento das células T CD4⁺ no seguimento; ausência de profilaxia secundária; história anterior de recaídas; e contagem de células T CD4⁺ abaixo de 100 células/μl no momento do

diagnóstico de LV (Cota *et al.*, 2011). Assim, chamamos atenção para a necessidade de treinamentos direcionados aos profissionais que lidam com LV, enfatizando novamente a necessidade da testagem para HIV em pacientes com diagnóstico de LV, tendo em vista a dificuldade que a coinfeção gera para o tratamento da LV e o entrecruzamento de áreas de prevalência de ambas as doenças no território do Estado de São Paulo.

No tocante à TARV, 50% dos casos de recidiva (5/10) estavam em uso da mesma, o que demonstra que não apenas a TARV seria responsável pela proteção ao retorno dos sintomas. A terapia antirretroviral, que foi introduzida no tratamento de indivíduos infectados pelo HIV em meados da década de 1990, é importante na diminuição da carga viral e no aumento das células T CD4⁺, o que impediria a evolução da LV latente para doença sintomática. Entretanto, esse aumento da contagem de células T CD4⁺ entre os coinfectados é mais lento, mesmo se a supressão viral é atingida (van Griensven *et al.*, 2013). Entre as drogas anti-HIV disponíveis, os inibidores da protease (IP's), que inibem ativamente a replicação do HIV por competição com o sítio de ligação da protease viral, merecem destaque em pacientes coinfectados. Efeitos diretos e indiretos sobre a *Leishmania* são demonstrados por estudos prévios (diminuição da atividade da aspartil peptidase ou do ortólogo Ddi1 do parasita, recuperação das células T CD4⁺, etc.). Seu uso estaria indicado: como profilaxia primária ou tratamento pré-emptivo nos assintomáticos com altos níveis de TCD4⁺; como terapia adjuvante nos sintomáticos; como profilaxia secundária nos tratados e com baixos TCD4⁺ (prevenindo recidivas); ou como manutenção nos não responsivos com pobre condição clínica e com disseminação parasitária difusa. Embora evidência científica suporte o uso de IP's no tratamento da LV, ainda há falta de evidência clínica para tal propósito (van Griensven *et al.*, 2013). Portanto, torna-se importante detectar e tratar infecções oportunistas simultâneas (especialmente a tuberculose), além de restaurar a função imune dos coinfectados com o uso da TARV. Ainda assim, um longo período de acompanhamento próximo pode ser desejável para detectar recaídas prontamente e manter a profilaxia secundária nos pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS.

Na avaliação da possível participação de diferentes genótipos do parasita nas variações dos desfechos e também na distribuição espacial dos casos de LV e LV-HIV/AIDS, observamos que não houve uma correlação entre genótipos específicos de *Leishmania infantum* e coinfeção ou não com HIV, ou ainda relacionado com os diferentes desfechos esperados. Na amostra do presente estudo, predominam casos

procedentes do noroeste do Estado, onde todos mostram similaridade genética com a *L. infantum* do sudoeste da Europa, segundo estudo prévio (Kuhls *et al.*, 2011). Dois *clusters* de *Leishmania infantum* estão presentes no Estado de São Paulo (um na região noroeste proveniente do Mato Grosso do Sul – conforme comentado no início dessa discussão – e outro na região sudeste), embora ambos pertençam ao mesmo zimodema MON-1, tanto em cães quanto em humanos (Motoie *et al.*, 2013; Kuhls *et al.*, 2011). A técnica de PCR-RFLP do kDNA de *Leishmania sp.* tem sido utilizada para análises microgenéticas entre cepas desse parasito com origens geográficas muito próximas, haja vista que os minicírculos do kDNA serem sujeitos a variações mais frequentes do que o DNA cromossômico (Alonso *et al.*, 2010; Botilde *et al.*, 2006). Suas vantagens são: alta sensibilidade e poder discriminatório; análise rápida, de baixo custo e simples; possibilidade de realização sem o desenvolvimento de cultura prévia. Assim, é uma técnica muito importante para epidemiologia molecular (Nasereddin *et al.*, 2009). Embora seja uma técnica que permite a distinção entre reinfecção e recidiva em pacientes coinfectados LV-HIV/AIDS, a PCR-RFLP do kDNA não é uma boa técnica para discriminar os pacientes HIV-positivos dos HIV-negativos (Botilde *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2001). No presente estudo, ficou ratificada tal afirmação, quando as amostras não mostraram uma distribuição em grupos por semelhança fenética. Assim como demonstrado previamente, uma alternativa seria a análise por microsatélites (pequenas repetições presentes no genoma dos organismos, encontrados em regiões codificantes e não-codificantes – principalmente nestas), que é um método cujos resultados são facilmente comparados com outros serviços, pois são regiões relativamente fáceis de clonar. Essa técnica mostra um alto nível de discriminação e é útil na caracterização de linhagens próximas em estudos genéticos epidemiológicos e populacionais (Motoie, 2013). A epidemiologia molecular não é apenas taxonomia, filogenia ou genética das populações, mas a aplicação dessas técnicas a problemas epidemiológicos, utilizando técnicas de biologia molecular para o estudo da distribuição e dos determinantes da ocorrência das doenças nas populações. Quando técnicas moleculares são aplicadas a estudos de doenças, as medidas de resultados amplificadas aumentam a habilidade de detectar associações vistas na realidade, promovendo medidas mais sensíveis e específicas, facilitando as atividades epidemiológicas (Foxman *et al.*, 2001).

Diante do cenário atual da LV mundialmente, nota-se que existem poucos estudos sobre a coinfeção LV-HIV/AIDS na América do Sul, especialmente no Brasil. Muitos destes são provenientes da África Oriental e do subcontinente indiano e estudos realizados em diferentes regiões do Brasil e da América do Sul são necessários, de tal forma que esses possam ser comparados uns com os outros e com os demais realizados no Velho Mundo. No presente estudo, pretendeu-se mostrar as características demográficas e clínicas da coinfeção LV-HIV/AIDS no Estado de São Paulo, sua resposta para o tratamento da LV com as diferentes drogas anti-*Leishmania* e sua distribuição espacial nas diversas regiões do Estado, e as possíveis semelhanças moleculares entre as espécies de *Leishmania* envolvidas. Tendo em vista a gravidade da coinfeção LV-HIV/AIDS e o aumento do número desses casos anualmente, torna-se imperativo estimular a pesquisa da infecção pelo HIV entre os casos LV (eliminando uma grande massa de casos ignorados quanto a essa coinfeção), haja vista os piores desfechos encontrados (maior letalidade e recidiva) e a necessidade de um tratamento mais eficaz e com menor quantidade de eventos adversos. Manifestações clínicas não-usuais da LV também devem ser pesquisadas nos casos HIV-positivos, pois o efeito sinérgico negativo da coinfeção permite ampla disseminação da *Leishmania* no indivíduo acometido. No período do estudo, foi detectado que a distribuição dos casos LV localiza-se principalmente no noroeste do Estado de São Paulo, assim como os coinfectados LV-HIV/AIDS. Contudo, chama-se atenção para a já marcante presença de casos de LV canina na região metropolitana da capital do Estado (área com grande concentração de casos HIV-positivos), o que pode facilitar o surgimento de casos de coinfeção LV-HIV/AIDS num território até então sem a presença de casos autóctones de LV (Lindoso and Goto, 2006; Motoie *et al.*, 2013). Estudos com outras técnicas moleculares, como o MLMT, poderiam gerar maiores contribuições para a compreensão da coinfeção LV-HIV/AIDS, tal como proposto pelo presente estudo, permitindo a comparação entre laboratórios de diferentes regiões e contribuindo para uma maior compreensão dos perfis genotípicos do parasita bem como da epidemiologia da leishmaniose visceral.

A colaboração entre os institutos de pesquisa (IMT/SP, UNESP-Botucatu, CVE/SES/SP, CRT DST-AIDS e Hepatites Virais – SES/SP) foi fundamental para a realização desse estudo, assim como a participação de profissionais em diferentes partes do mesmo. Embora algumas limitações tenham ocorrido, haja vista terem sido

utilizados dados secundários de um programa de rotina epidemiológica, pela primeira vez demonstrou-se as características da LV no Estado de São Paulo através de um estudo retrospectivo. Portanto, vislumbra-se a necessidade de desenvolvimento de ensaios clínicos randomizados e prospectivos, avaliando a segurança e a eficácia dos diversos regimes propostos para o tratamento de pacientes LV e de coinfectados LV-HIV/AIDS. A falta desses estudos deixa uma lacuna importante no conhecimento da resposta terapêutica em pacientes coinfectados VL-HIV/AIDS, uma vez que esta coinfeção está aumentando o número de casos em várias regiões do mundo, com impacto direto sobre a evolução clínica de ambas as doenças. Assim, as contribuições a serem desencadeadas pelos achados no presente estudo objetivam a implantação de medidas de prevenção e controle em determinadas regiões do Estado, gerando intervenções que visem à redução da letalidade por leishmaniose visceral no Estado de São Paulo.

CONCLUSÕES

Avaliando-se as características clínicas, epidemiológicas, imunológicas e parasitárias de pacientes com LV-HIV/AIDS e comparando com pacientes com LV, observa-se inicialmente que no grupo de pacientes coinfectados há maior letalidade e recidiva, além de encontramos um aumento progressivo na prevalência da coinfecção LV-HIV/AIDS ao longo do período do estudo. Pacientes com diagnóstico de LV HIV-negativos prevaleceram na faixa etária abaixo de 10 anos e a coinfecção LV-HIV/AIDS acometeu principalmente adultos de 31 a 50 anos de idade, do sexo masculino, acompanhando a faixa etária de maior prevalência de HIV/AIDS no Brasil. As características clínicas foram semelhantes em ambos os grupos e detectou-se maior mediana de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos coinfectados que evoluíram para cura.

Quando se avalia a resposta ao tratamento anti-*Leishmania* no grupo de coinfectados LV-HIV/AIDS, observa-se que os principais medicamentos utilizados mostram resposta clínica semelhante; no entanto, houve maior letalidade naqueles que foram tratados com anfotericina B deoxicolato do que nos tratados com antimonial pentavalente e anfotericina B lipossomal.

Os casos de LV mostram distribuição espacial na região noroeste do Estado, assim como dos coinfectados LV-HIV/AIDS, área onde há entrecruzamento das duas entidades clínicas.

As 32 variações genotípicas de *Leishmania infantum* provenientes de pacientes com diagnóstico de LV do estado de São Paulo não tiveram correlação com distribuição espacial, letalidade ou infecção pelo HIV.

REFERÊNCIAS**

1. Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JRS, Dorval ME, Da-Costa FD, Pereira GR, da Cunha RV, Paniago AM, Da-Cruz AM. HIV/AIDS-associated Visceral Leishmaniasis in Patients from an Endemic Area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(5):692-7.
2. Alonso DP. Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de *Leishmania infantum chagasi* no Brasil. [Tese de doutorado]. Botucatu, SP: Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, 2011.
3. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. *Clin Microbiol Rev*. 1997(Apr);10(2):298-319.
4. Alvar J, Aparicio P, Asefa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, Gradoni L, Horst RT, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second ten years. *Clin Microbiol Rev*. 2008(Apr);21(2):334-59.
5. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:1933-38.
6. Balassegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Genovese GO, Milani B, Gaspani S, Potet J, Chappuis F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012;17(4):493-510.
7. Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN, Figueras C, Gradoni L, Kafetzis DA, Ritmeijer K, Rosenthal E, Royce C, Russo R, Sundar S, Alvar J. Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2006;43:917-24.
8. Boletim Epidemiológico AIDS-DST (versão preliminar) [Ministério da Saúde]. Ano IX, No 1. Brasília/DF, 2012.

** De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schonian G, Dujardim J. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol.* 2006(Nov);6(6):440-6.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV* [Série A. Normas e Manuais Técnicos]. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2011. 106p.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. [Série A. Normas e Manuais Técnicos]. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2006. 1ª Edição, 120p.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e hepatites virais. *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos convivendo com HIV/AIDS – versão preliminar*. Brasília, DF. Editora do Ministério da Saúde, 2013.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria No- 151, De 14 De Outubro De 2009. *Diário Oficial da União*. Brasília/DF. Seção 1. Nº 198, 16 de outubro de 2009. ISSN 1677-7042. Imprensa Nacional.
14. Clayton D, Hills M. *Statistical Models in Epidemiology*. Oxford: Oxford Science Publications; 1996.
15. Correa Antonialli SA, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect.* 2007(May);54(5):509-14.
16. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6): e1153.
17. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of Anti-Leishmania Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5): e2195.
18. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania and HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006 (Mar);123(3):357-88.

19. Daher EF, Fonseca PP, Gerhard ES, Leitão TM, Silva Júnior GB. Clinical and Epidemiological Features of Visceral Leishmaniasis and HIV Co-infection in Fifteen Patients from Brazil. *J Parasitol.* 2009 (Jun);95(3):652-5.
20. Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E. Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy on the Incidence of Visceral Leishmaniasis in a French Cohort of Patients with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis.* 2002 (Nov);186:1366-70.
21. Den Boer ML, Alvar J, Davidson RN, Ritmeijer K, Balasegaram M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009(Sept); 14(3):395-410.
22. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003(Oct);97(1):3-15.
23. DeVita Jr V, Hellman S, Rosember SA. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention.* 3rd ed. Impresso nos Estados Unidos da América, Philadelphia, Pennsylvania. 1992.
24. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa A de A, Lima JW, Pearson RD. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis.* 1992;166(5):1124-32.
25. Fernandez-Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mójér F, Muñiz G, Górgolas M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop.* 2004(Mar);90(1):11-6.
26. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: Focus on infection. *Am J Epidemiol.* 2001;153:135-41.
27. Hailu W, Weldegebreal T, Hurissa Z, Tafes H, Omollo R, Yifru S, Balasegaram M, Hailu A. Safety and effectiveness of meglumine antimoniate in the treatment of Ethiopian visceral leishmaniasis patients with and without HIV co-infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010(Nov);104(11):706-12.
28. IBGE, Censo Demográfico 2010. [on line]
(http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/Sao_paulo.pdf)
29. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schonian G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among

- Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e115.
30. Laguna F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003(Oct);97(1):135-42.
 31. Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, Doncker S, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Schonian G, Kuhls K, Chappuis F, Dujardim J. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donivani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infect Genet Evol*. 2007(7);206-12.
 32. Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs – current knowledge and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008;23:708-18.
 33. Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PVS, Pontes NN, Barbosa JDA, Martins DR, Weirather JL, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SMB. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(1):99-107.
 34. Lima IP, Muller MC, Holanda TA, Harhay M, Costa CHN, Costa DL. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(2):156-60.
 35. Lindoso JAL, Goto H. *Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras*. Boletim Epidemiológico Paulista. Fevereiro de 2006. Ano 3, No 26. [acessado em agosto de 2013]. Disponível em:
http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lva.htm
 36. Madalosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, Lindoso JA. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *J Trop Med*. 2012;2012:281572, 7p.
 37. Magill AJ. *Leishmania* species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. In: *Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th Ed. Philadelphia, Pennsylvania (EUA): Churchill Livingstone - Elsevier; 2010. Chapter 276, p3463-80.
 38. Moir S, Connors M, Fauci AS. The immunology of Human Immunodeficiency Virus Infection. In: *Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas,*

- and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th Ed. Philadelphia, Pennsylvania (EUA): Churchill Livingstone - Elsevier; 2010. Chapter 120, p1687-1703.
39. Monteiro GR, Nascimento ET, Nascimento PRP, Lovell A, Wilson ME, Jeronimo SMB. IL-10 in the pathogenesis of visceral leishmaniasis. [Pôster apresentado no Worldleish 5, 2013; Porto de Galinhas/PE, Brasil].
 40. Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:104-7.
 41. Motoie G, Ferreira GEM, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*. 2013;18:48-59.
 42. Motoie G. Caracterização genotípica de *Leishmania (Leishmania) infantum* proveniente de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. [Tese de doutorado]. São Paulo, SP: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.
 43. Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM. The Emergence of Concurrent HIV-1/AIDS and Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105:298-300.
 44. Nasereddin A, Azmi K, Jaffe CL, Ereqat S, Amro A, Sawalhah S, Baneth G, Schönian G, Abdeen Z. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. *Vet Parasitol*. 2009(Apr)6;161(1-2):126-30
 45. Nicolas L, Prina E, Thierry Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol*. 2002;40:1666-9.
 46. Noyes AH, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes direct from clinical samples and its application to the study of epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microb*. 1998;36(10):2877-81.
 47. Pintado V and Lopez-Velez R. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect*. 2001(Jun);7(6):291-300.

48. Rabello A, Osrini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97(1):S17-S28.
49. Ritmeijer K, ter Horst R, Chane S, Aderie EM, Piening T, Collin SM, Davidson RN. Limited effectiveness of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high HIV prevalence. *Clin Infect Dis*. 2011(Dec);53(12):e152-8.
50. Russo R, Laguna F, Lopez-Velez R, Medrano FJ, Rosenthal E, Cacopardo B, Nigro L. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97(1):S99–S105.
51. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CR, Cunha RV, Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011(Jul);5(7):e1198.
52. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids (CRT-DST/AIDS-SP). Programa Estadual de DST/Aids de São Paulo. Boletim Epidemiológico CRT-DST/AIDS. Ano XXVIII, No 1, Dezembro de 2011.
53. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN/CCD/SES/SP). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo*. São Paulo: A Secretaria, 2006.
54. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 2013;17:572-6.
55. Schneider E, Whitmore S, Glynn MK, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT, editors. Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years --- United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57(RR10):1-8. Last reviewed in 20/11/2008.

56. Schonian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitol.* 2010;16:1-21.
57. Schonian, G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H D, Presber, W, Jaffe C L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(1):349-58.
58. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis and management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res.* 2005(Apr):407-14.
59. Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Kumar N, Verma N, Mahajan R, Kumar P, Kumar R, Das P, Mitra G, Flevaud L, Ferreyra C, Remartinez D, Pece M, Palma PP. Liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clin Infect Dis.* 2011;53(7):e91–e98.
60. Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(2):106-13.
61. Sundar S. Drug Resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001(Nov);6(11):849-54.
62. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):427-34.
63. UNAIDS. (<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>). Acessado em 21/02/2013.
64. Van Griensven J, Diro E, Lopez-Velez R, Boelaert M, Lynen L, Zijlstra E, Dujardin JC, Hailu A. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:251-9.
65. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010
66. WHO. Leishmaniasis. [Online] World Health Organization. [Citado em 22 de Mai de 2013] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
67. WHO, 2011a. Leishmaniasis. *Magnitude of the Problem*. [Online] World Health Organization. [Citado em: 15 de Fev de 2011.] http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html

68. WHO, 2011b. Leishmaniasis. *Leishmania and HIV coinfection*. [Online] World Health Organization. [Citado em: 15 de Fev de 2011.] http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html.